



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학박사 학위논문

성상교세포-신경세포간의 상호작용과
소포체 스트레스가 알츠하이머병의
병인기전에 미치는 영향 연구

Studies on the mechanism of
astrocyte-neuron interactions and ER
stress in Alzheimer's disease
pathogenesis

2014 년 8 월

서울대학교 자연과학대학원

유전공학 협동과정 전공

정 은 선

성상교세포-신경세포간의 상호작용과
소포체 스트레스가 알츠하이머병의
병인기전에 미치는 영향 연구

지도교수 목 인 희

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2014 년 08 월

서울대학교 자연과대학원

유전공학 협동과정 전공

정 은 선

정은선의 이학박사 학위논문을 인준함

2014 년 08 월

위 원 장 (인)

부위원장 (인)

위 원 (인)

위 원 (인)

위 원 (인)

Studies on the mechanism of
astrocyte–neuron interactions and ER
stress in Alzheimer’s disease
pathogenesis

Interdisciplinary Graduate Program
in Genetic Engineering
In Seoul National University
By Eun Sun Jung

August, 2014

Doctor’ s Committee:

Professor _____Chairman

Professor _____Vice chairman

Professor _____

Professor _____

Professor _____

초 록

활성화 된 미세아교세포와 재활성화 된 성상교세포는 알츠하이머병 (Alzheimer' s disease, AD)의 병리학적 특징 중의 하나인 노인반점 (senile plaque) 주변에서 공통적으로 발견된다. 성상교세포는 주변에 존재하는 신경세포와 상호작용하면서 ATP를 포함한 여러 가지 신경아교 전달물질을 분비한다고 알려져 있지만 어떻게 신경세포의 활성화를 조절하는지에 대한 정확한 기전과 병인과의 연관성은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 알츠하이머병에서 신경아교 전달물질 중 하나인 ATP의 분비변화와 ATP가 신경세포에 어떻게 영향을 주고 그로 인해 시냅스 가소성이 조절되는지에 대해 확인하고자 하였다. 그와 더불어 신경아교 전달물질의 분비와 시냅스 활성화에 주요한 역할을 담당하는 칼슘이 알츠하이머병에서 소포체 스트레스를 유도한다는 것이 알려져 있기 때문에 소포체 스트레스가 알츠하이머병의 원인 단백질인 베타 아밀로이드 ($A\beta$)의 전구 단백질로 알려진 APP에 어떠한 영향을 주는지 규명해 보고자 하였다. 먼저 알츠하이머병의 원인 독성 단백질인 $A\beta$ 에 의해 신경아교 전달물질인 ATP의 분비가 초대 배양한 성상교세포에서 증가되는 것을 확인하였다. 또한 이렇게 분비된 ATP가 놀랍게도 $A\beta$ 처리에 의해서 저해된 시냅스 가소성과 밀접한 관련이 있는 시냅스 신호전달 및 구조와 관련된

단백질들의 발현, Field EPSPs (Field excitatory postsynaptic potentials; fEPSPs), 신경세포의 수상돌기가시 (dendritic spine) 밀도에 대해서 purinergic 수용체를 통해 보호하는 효과를 나타냄을 초대 배양한 해마 신경세포에서 규명하였다. $A\beta$ 는 또한 세포 내 칼슘 항상성을 방해한다고 알려져 있고 이런 칼슘 스트레스를 비롯하여 여러 종류의 소포체 스트레스를 유도했을 때 APP가 ubiquitin-proteasome system을 통해 급격하게 분해 됨을 확인하였다. 그리고 알츠하이머병에서처럼 proteasome 활성이 망가져 있는 상황에서는 APP가 소포체 스트레스를 받았을 때 소포체에 비정상적으로 축적되는 것 또한 관찰하였다. 따라서 성상교세포와 신경세포 사이의 상호작용과 신경아교 전달물질의 분비 및 세포 내 스트레스 상황에서 proteasome의 활성을 조절한다면 알츠하이머병의 치료를 위한 약물 개발의 새로운 목표점으로 발전할 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: 알츠하이머병, 베타 아밀로이드, 시냅스가소성, ATP, APP, ER stress, 칼슘, UPS

학 번: 2009-30843

도표 및 약어 목록

- 3MA : 3-methyladenine
- aCSF : artificial cerebrospinal fluid
- A β : amyloid beta peptide
- AD : Alzheimer's disease
- AMC : 7-amino-4-methylcoumarin
- APP : amyloid precursor protein
- ATP γ S : adenosine 5' - [γ -thio] triphosphate
- Baf : Bafilomycin
- BACE : beta site APP-cleavage enzyme
- DMEM : Dulbesco's modified Eagle's medium
- EC₅₀ : half maximal effective concentration
- ECL : Enhanced chemiluminescence
- ER : endoplasmic reticulum
- ERAD : ER-associated degradation
- fEPSPs : Field excitatory postsynaptic potentials
- FBS : fetal bovine serum
- HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
- HRP : horse radish peroxidase
- LTP : Long-term potentiation
- NFT : neurofibrillary tangle
- PFA : paraformaldehyde
- PPADS : pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2, 4'-disulphonic acid
- sAPP α : soluble APP-alpha
- TBS : theta burst stimulation
- UPR : unfolded protein response,
- UPS : ubiquitin-proteasome system
- Veh : vehicle

목 차

초록.....	i
도표 및 약어 목록.....	iii
목차.....	iv
표 및 그림 목록.....	v
서론.....	1
실험재료 및 방법	13
결과.....	24
고찰.....	54
결론.....	67
참고문헌	68
초록 (영문)	84

표 및 그림 목록

그림 1. Amyloid precursor protein의 대사과정	5
그림 2. 건강한 중추신경계에서의 성상아교세포 기능.....	6
그림 3. 성상아교세포로부터 유래한 신호에 의한 시냅스전과 시냅스후의 시냅스 전달 조절.....	7
그림 4. 퇴행성신경질환과 UPS	11
그림 5. 소포체에서 일어나는 단백질 접힘, 품질검사와 신호전달	12
그림 6. Primary astrocyte와 U373 세포주에서 $A\beta$ 42 처리 시 분비되는 ATP 측정.....	30
그림 7. primary rat hippocampal neuron 에서 $A\beta$ 42에 의한 수상돌기가시 밀도의 감소에 대한 ATP 효과 규명	31
그림 8. 해마절편에서 $A\beta$ 42에 의한 LTP 저하에 대한 ATP의 효과 규명	32
그림 9. Primary hippocampal neurons에서 $A\beta$ 42에 의해 감소한 시냅스 단백질에 대한 ATP 효과 확인.....	35
그림 10. $A\beta$ 42에 의해 감소되는 시냅스 단백질에 대한	

ATP의 효과가 P2 purinergic 수용체를 통합을 PPADS를 이용하여 규명	37
그림 11. 세포 내 칼슘증가가 APP 대사과정에 미치는 영향 확인	45
그림 12. 소포체 스트레스가 APP의 분해를 유도함을 확인	47
그림 13. APP가 소포체 스트레스 상황에서 APP가 프로테아좀에 특이적인 경로를 통해서 분해됨을 확인..	49
그림 14. 세포 내 칼슘 증가에 의한 APP의 유비퀴틴화 확인 ...	50
그림 15. 소포체 스트레스가 소포체 연관 단백분해과정을 통해 APP의 안정성을 조절함을 규명.....	51
그림 16. 소포체 스트레스 상황에서 프로테아좀 저해 시 APP가 소포체에 축적됨을 확인	53

서 론

알츠하이머병 (Alzheimer' s disease; AD)은 장기간에 걸친 시냅스와 신경세포의 기능저하 및 사멸에 기인하는 대표적인 퇴행성 신경질환으로 치매 환자 중 50~60%가 이에 해당한다. 임상적인 특징으로는 기억과 판단, 언어능력 등과 같은 지적 기능의 점진적인 감퇴 및 일상생활능력, 인격, 행동양상 장애 등이 알려져 있다. 현대 의학의 발달과 더불어 최근 평균수명이 증가됨에 따라서 대부분의 노인층에서 발병하게 되는 특징과 맞물려 알츠하이머병을 앓고 있는 환자수는 계속적으로 증가하고 있는 추세이다 (1). 알츠하이머병의 가장 대표적인 병리학적 특징은 비정상적 과다생성과 불충분한 제거로 세포 밖에 베타 아밀로이드 (amyloid beta peptide; $A\beta$)가 축적되어 나타나는 노인반점 (senile plaque)과 세포 내 tau 단백질의 과인산화로 인한 신경섬유 덩어리 (neurofibrillary tangle; NFT)가 있다 (2). $A\beta$ 는 베타-시크리테아제 (β -secretase, BACE1)와 감마-시크리테아제 (γ -secretase complex)에 의해 아밀로이드 전구 단백질 (amyloid precursor protein; APP)이 순차적으로 잘리면서 생성된다 (3)(그림 1).

Part 1. 신경아교 전달물질인 ATP가 $A\beta$ 에 의한 시냅스

가소성 변화에 미치는 영향 연구

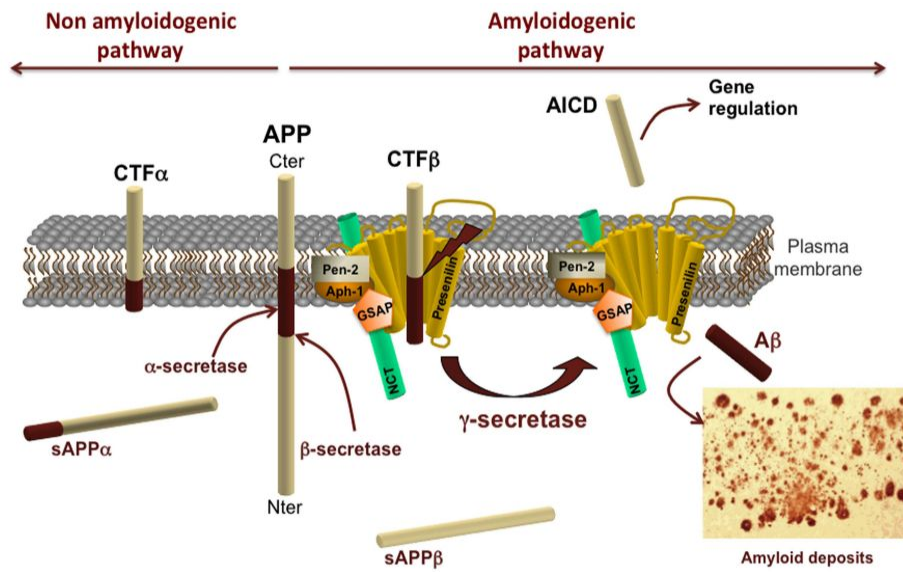
알츠하이머병의 주요 병리학적 특징인 노인반점 주변에서는 활성화된 미세아교세포와 재활성화 된 성상교세포, 그리고 퇴행된 신경세포들이 관찰된다고 보고되었다 (4, 5). 성상교세포는 중추신경계를 구성하는 세포중에서 가장 많은 비율로 존재는 주요한 신경교세포의 한 종류이다 (6). 성상교세포는 주변에 존재하는 신경세포, 뇌혈관세포 그리고 다른 신경교세포들의 중요한 파트너 세포로서 신경세포의 구조와 대사를 돕는 기능뿐만 아니라 뇌에서 신경 활성화의 조절을 주도적으로 할 수 있다. 성상교세포의 주요 기능 중의 하나는 신경세포의 시냅스 간극에서 신경전달물질 또는 신경아교 전달물질들을 흡수하거나 분비하는 것이다 (그림 2) (7). 신경아교 전달물질은 신경교세포로부터 분비되는 물질로 성상교세포는 직접적으로 glutamate, D-serine, ATP와 같은 신경아교 전달물질들을 분비하여 신경세포의 수용체를 활성화 할 수 있다 (8). 성상교세포에서 분비되는 glutamate는 신경세포의 흥분성에 많은 효과를 가함이 알려져 있는 반면에 D-serine은 NMDA 수용체가 매개하는 시냅스 가소성의 조절에 기여한다는 보고가 있다 (그림 3) (9, 10). 그리고 성상교세포로부터 분비된 ATP는 중요한 세포 밖 신호전달 물질이면서 직접적 또는 대사산물인 adenosine을 통해 시냅스 전달을 조절하는 purinergic 수용체의 내성 리간드로 작용한다고 알려져 있다 (그림 3) (11,

12). 성상교세포 유래 ATP는 시냅스 후 purinergic 수용체의 활성을 통해서 mEPSCs (miniature EPSPs)의 진폭을 증가시키는 반면에 또 한편으로는 해마부위에서 GABAergic 뉴런이 매개하는 이중 시냅스 저하에 기여한다는 보고가 있다 (13, 14). 이는 성상교세포가 여러 종류의 성상아교 전달물질을 분비하여 신경 활성화를 여러 방법으로 조절 할 수 있을 것을 예상할 수 있고 성상아교 전달물질은 표적 신경세포 또는 시냅스에 따라서 다른 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

활성화 된 성상교세포는 알츠하이머병 모델 마우스 뇌의 $A\beta$ 가 축적되어있는 노인반점 주변에서 발견되고 이는 성상교세포와 노인반점 사이에 중요한 상호작용이 존재한다는 것을 의미한다 (15, 16). 그러나 성상아교 전달물질, 그 중에서도 ATP가 알츠하이머병의 병인기전에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 ATP가 시냅스 활성화에 영향을 미치는 지에 대해서 알아보고자 하였다.

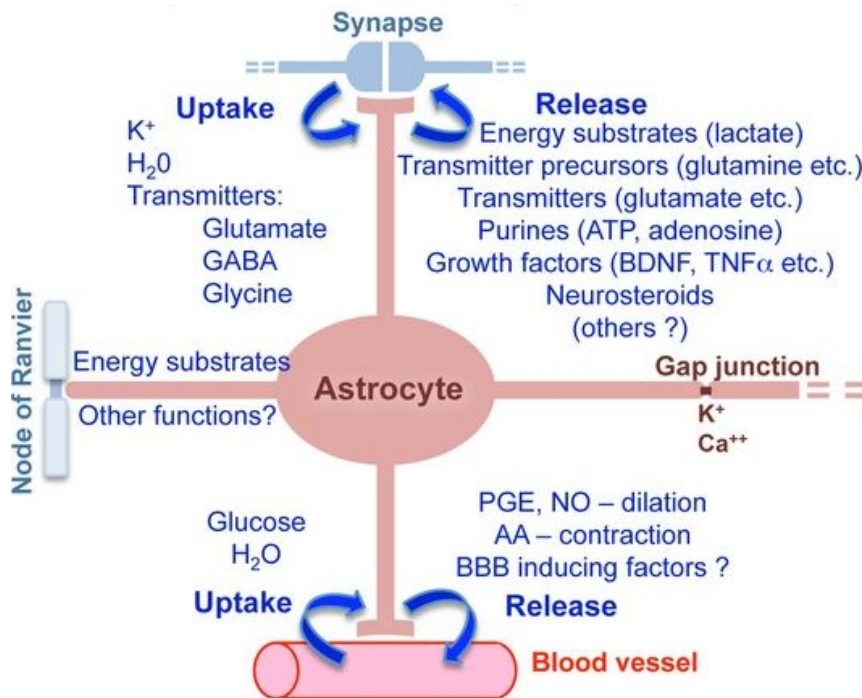
본 연구에서는 $A\beta$ 와 관련 있는 시냅스 변화가 성상아교 전달물질인 ATP에 의해서 보호된다는 것을 확인하였다. 구체적으로 살펴보면, $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도된 시냅스 단백질들의 양, 수상돌기가시 (dendritic spine)의 밀도 그리고 장기 상승 작용 (Long-term potentiation; LTP)을 포함한 시냅스 가소성의 저해와 변화가 ATP에 의해 복구 되는 것을 실험적으로 증명하였다. 더

나아가 본 연구에서는 ATP의 이와 같은 보호적인 역할이 P2 purinergic 수용체 신호전달 경로를 통해서 매개됨을 추가적으로 확인하였다. 이 같은 여러가지 결과들을 종합해 보았을 때 성상아교 전달물질 중의 하나인 ATP가 신경독성을 띄는 $A\beta$ 가 원인이 되는 여러 시냅스 기능 장애들에 반하여 보호적인 역할을 한다는 것을 규명하였다. 따라서 성상아교 전달물질인 ATP를 통한 성상교세포와 신경세포 사이의 상호작용이 시냅스 조절에 매우 중요한 역할을 할 것으로 기대되는 바이다.



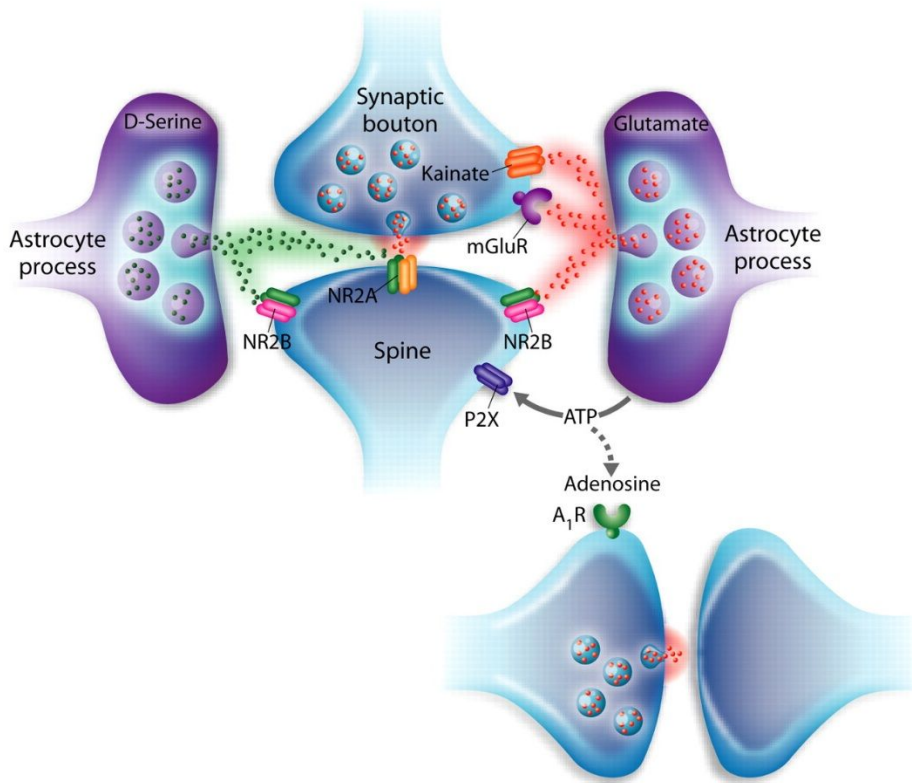
(Vingtdeux et al. *Front. Physiol.*, 05 July 2012)

그림 1. Amyloid precursor protein 의 대사과정



(*Acta Neuropathol* (2010) 119:7–35)

그림 2. 건강한 중추신경계에서의 성상아교세포 기능



(Philip G. Haydon et al, *Physiological Reviews*, 1 July 2006)

그림 3. 성상아교세포로부터 유래한 신호에 의한 시냅스전과 시냅스후의 시냅스 전달 조절

Part 2. 소포체 스트레스가 베타 아밀로이드 전구 단백질을 조절하는 기전 연구

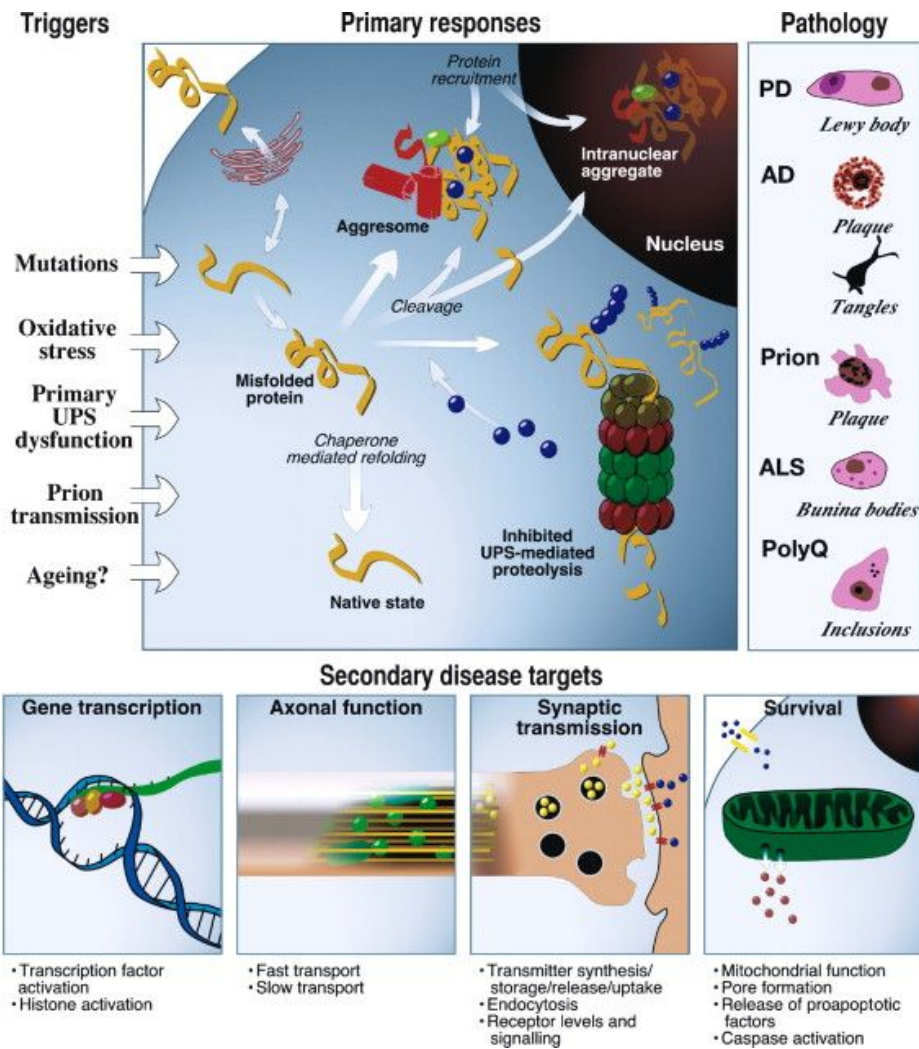
칼슘은 뇌에서 일어나는 다양한 일들에 대해서 매우 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 이런 칼슘이 알츠하이머병 환자의 뇌에서 보이는 퇴행된 신경세포에서 그 양이 증가되어 있다는 보고가 있다 (17). 베타 아밀로이드 전구 단백질 (amyloid precursor protein; APP)은 내재 막 단백질로 알츠하이머병의 병인기전에 중요한 역할을 한다. 여러 보고들을 통해서 칼슘 항상성의 불균형이 APP 대사과정에 영향을 준다는 것이 알려져있다 (18, 19). 이런 칼슘과 APP 대사과정간의 중요성에도 불구하고 이와 관련된 세부적인 기작은 많이 알려져 있지 않다.

유비퀴틴-프로테아좀 시스템 (ubiquitin-proteasome system; UPS)는 진핵세포에서 단백질의 순환을 위한 세포 내의 주요한 경로이면서 (20) 알츠하이머병 뿐만 아니라 헌팅턴병, 파킨슨병, 프리온병 그리고 루게릭병을 포함한 여러 종류의 퇴행성 신경질환과도 밀접한 관련이 있다는 것이 보고를 통해 알려진 바 있다 (그림 4) (21). 최근 규명된 증거들은 비정상적인 단백질 접힘과 응집이 다양한 퇴행성 신경질환의 공통적인 원인인 것과 동시에 병리학적인 변화를 보인다고 제시하고 있다. 유비퀴틴은 알츠하이머병의 두 가지 주요 병리학적 특징인 노인반점과 신경섬유 덩어리 모두에서 축적되어 있음이 보고되었다 (22, 23).

몇몇 연구자들은 프로테아좀 활성이 알츠하이머병 환자 뇌에서 변질 되어있음을 확인하였고 이 결과를 통해서 프로테아좀 시스템의 비정상적인 조절이 알츠하이머병의 발생에 밀접하게 관계되어 있음을 제시하였다 (24, 25). 유비퀴틴-프로테아좀 시스템 (UPS)은 또한 소포체 스트레스에 의해 매개되는 잘못 접혀진 단백질들의 분해에 매우 중요한 역할을 한다 (26). 이와 같은 비정상적인 소포체 단백질들의 증가는 매우 신속히 ‘접히지 않은 단백질 반응’ (unfolded protein response, UPR)과 소포체 연관 단백질분해 과정 (ER-associated degradation; ERAD)을 활성화시킨다고 알려져 있다 (27, 28) (그림 5). 비정상적인 칼슘 항상성은 소포체 스트레스와 기능저하를 유도하는 요인중의 하나이다 (29).

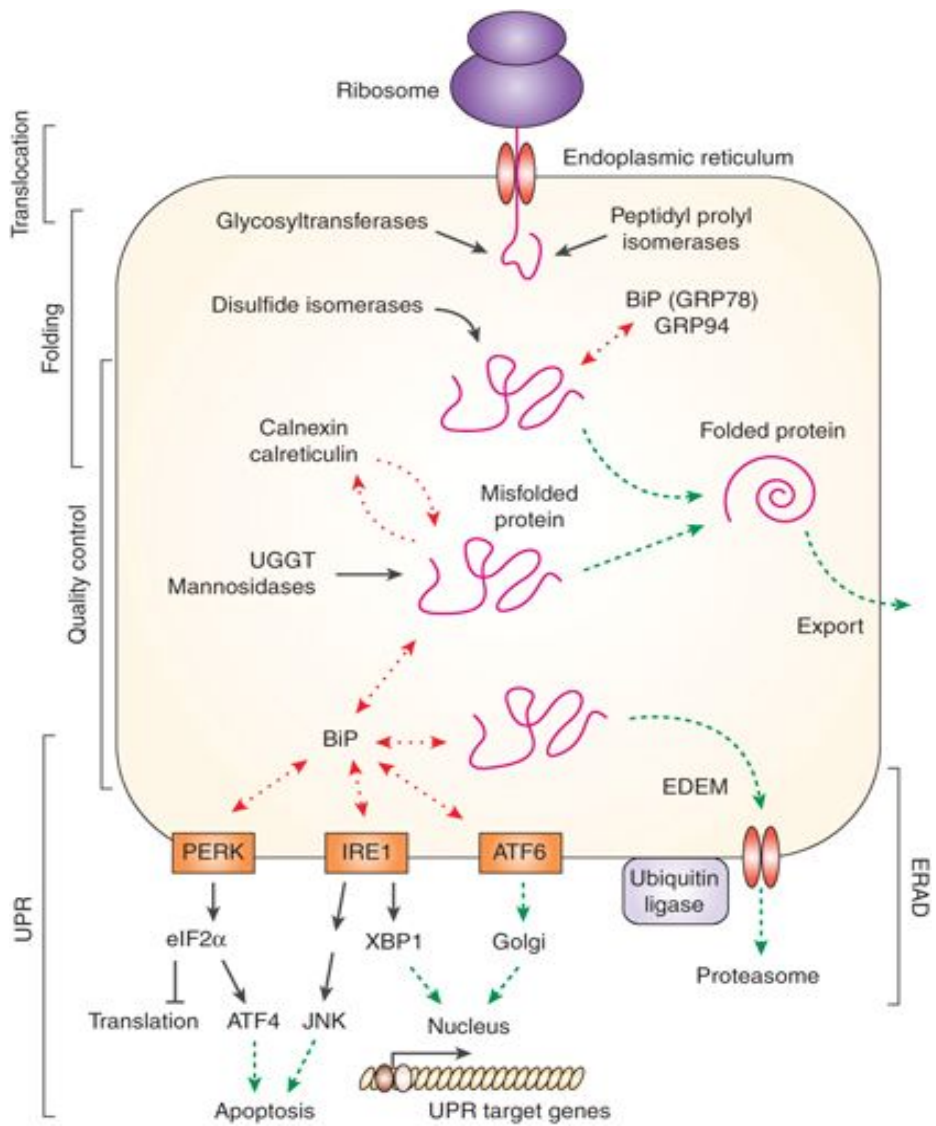
APP 는 소포체에서 만들어 진 뒤 분비 경로를 통해서 원형질막으로 이동된 뒤 알파-시크리테아제에 의해 잘려지면서 신경보호성질을 가진 sAPP α (soluble APP- α)를 형성하는 반면, 신경독성을 띄는 A β 는 소포체와 골지/후기골지망에서 베타-시크리테아제와 감마-시크리테아제의 순차적인 절단에 의해서 생성된다 (30, 31). 그러므로 APP 의 대사과정과 세포 내 위치에 대한 연구는 알츠하이머병의 병인기전을 밝히는데 있어서 중요하다. 최근의 연구들은 비정상적인 칼슘 항상성을 포함한 소포체 스트레스가 APP 의 대사과정에 영향을 미칠 뿐만 아니라 알츠하이머병의

중심적인 병리적 현상임을 시사하였다 (32). 그렇지만 소포체 스트레스 상황에서 APP 대사과정과 UPS 경로 사이의 관계는 밝혀진 바가 미흡하다. 본 연구에서는 이러한 비정상적인 세포 내 칼슘 양의 증가와 같은 소포체 스트레스 상황에서 APP 가 APP 의 유비퀴틴화를 조절하는 효소와의 상호작용에 의해 UPS 를 통하여 매우 극적인 분해를 겪게 됨을 확인하였다.



Neuron, Vol. 40, 427–446, October 9, 2003

그림 4. 퇴행성신경질환과 UPS



Kidney International (2010) 77, 187–193

그림 5. 소포체에서 일어나는 단백질 접힘, 품질검사와 신호전달

실험 재료 및 방법

Part 1. 신경아교 전달물질인 ATP 가 $A\beta$ 에 의한 시냅스 가소성 변화에 미치는 영향 연구

1. 실험에 이용된 실험동물

Primary hippocampal neuronal culture를 위해서 암컷 Sprague-Dawley rats (KOATECH, Korea)의 18일된 배아 (embryos; E18)와 임신한 ICR mice로부터 출생한 날 (postnatal day 1; P1)의 새끼 쥐를 이용하여 primary hippocampal neuronal culture와 astrocyte culture를 하였다. 또 field EPSPs (fEPSPs)를 측정하기 위하여 3~4개월 된 수컷 C57BL/6 mice를 사용하였다.

2. 세포주 (Cell lines) 및 세포배양

세포는 human astrocyte 세포주인 U373을 사용하였고 0.1 mg/ml penicillin/streptomycin (P/S; Sigma, MO, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, UT, USA)이 포함된 Dulbesco's modifiec Eagle's medium (DMEM; Hyclone, UT, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. P1의 ICR mice의 hippocampus와 cortex 부분을 분리하여 잘게 자른 다음 Hank's

Balanced Salt Solution (HBSS; WelGENE, Korea)에 옮긴 후 0.5% trypsin (2.5% trypsin; Sigma, MO, USA)으로 하나의 세포로 분리시키는 과정을 거친다. 분리한 세포는 세포 수를 측정한 후에 poly-D-lysine (Sigma, MO, USA)으로 코팅해 둔 plate에 잘아준다. Astrocyte culture는 cortex로부터 분리한 세포를 U373 세포와 동일한 조건에서 배양하였고 hippocampal neuron은 0.1mg/ml PS, L-glutamine (0.5 mM), B27 (Invitrogen, California, USA)이 포함된 neurobasal medium (Invitrogen, California, USA)에서 배양하였다.

3. 시약 및 시약처리

ATP, adenosine 5' -[γ -thio] triphosphate (ATP γ S), PPADS (pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2, 4'-disulphonic acid; a P2X purinergic receptor antagonist)는 Sigma에서 구입하였고 $A\beta_{1-42}$ 는 American Peptide (Sunnyvale, CA, USA)에서 구입하였다. $A\beta_{1-42}$ 는 U373 세포와 astrocyte에 각각 2 또는 10, 2 또는 4 μ M 농도로 3시간 처리하였고 primary hippocampal neuron에는 2 μ M로 48시간 동안 처리하였다. ATP와 ATP γ S 그리고 PPADS는 $A\beta_{1-42}$ 처리 30분 전에 미리 처리하였다.

Primary neuron에 시약을 처리할 때에는 기존 배양 미디어의 반을 제거하고 새 배양 미디어 반에 최종 처리 농도로 시약을 희석한 다음 추가하는 방법을 사용하였다.

4. 전기생리

(본 실험은 포항공대 김정훈 교수님 실험실에서 진행하였다)

Field EPSPs (fEPSPs)를 3~4개월의 수컷 C57BL/6 쥐로부터 얻은 해마 절편 (400 μ m 두께)에서 측정하였다. 해마 조직은 37°C 산소화 된 (95% O₂, 5% CO₂) 인공의 뇌척수액 (artificial cerebrospinal fluid ; aCSF)에서 1시간 이상 두고 계속해서 산소화 된 aCSF를 관류시켜주었다. fEPSPs는 해마의 CA1의 striatum radiatum 부위에서 microelectrode를 이용하여 측정하였다. LTP는 5번의 0.1Hz의 theta burst stimulation (TBS)으로 유도하였다. 테이터는 Axopatch 200A amplifier와 Digidata 1200 (Axon Instrument)를 통해서 얻었다.

5. Western Blot

단백질 양을 측정하기 위해 시약 처리가 끝난 세포에 RIPA buffer를 이용하여 총 단백질을 추출하고 BCA 방법으로 정량

하였다. 정량 후 20~30 μ g의 단백질을 8% SDS-PAGE gel에 전기영동하고 PVDF membrane (millipore, MA, USA)에 4℃에서 90분간 transfer한 후 1시간 동안 5% skim milk로 실온에서 blocking 하였다. 이 후 보고자 하는 단백질에 특이적인 1차 항체를 4℃에서 하루 동안 반응 시킨 후 horse radish peroxidase (HRP)가 결합 된 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 단백질에 결합한 항체는 Enhanced chemiluminescence (ECL) solution (GE Healthcare)을 이용하여 LAS-3000 (Fugi photo Film, Japan)으로 분석하였다. 사용한 1차 항체는 다음과 같다.

Anti-NMDAR2A antibody (1:2000; Millipore, MA, USA), anti-NMDAR1 antibody (1:2000; Cell Signaling Technology, MA, USA), anti-PSD-95 antibody (1:2000; Abcam), anti- β -actin (1:2000; Sigma-Aldrich, MO, USA), and anti-tubulin antibody (1:2000; Applied Biological Materials).

6. ATP 측정

U373 세포와 astrocyte에서 분비되는 ATP를 측정하기 위해 ATP determination kit (A22066; Invitrogen)를 사용하였다. Luciferase가 substrate인 luciferin을 자르기 위해 ATP가

사용되는 원리를 이용하여 ATP를 측정하는 방법으로 시약 처리가 끝난 후 배양 된 세포의 배지 100 μ l를 kit에서 제공하는 용액과 반응시킨 다음 luminometer (Infinite M200, Tecan)로 분석하였다.

7. Phalloidin 염색

신경세포의 수상돌기가시 (dendritic spine)의 밀도 정도를 확인하기 위해서 phalloidin으로 염색하였다. 시약 처리 후 PBS로 두 번 세척하고 4% paraformaldehyde (PFA)로 실온에서 10분간 고정 한 뒤 0.1% Triton X-100으로 3~5분간 실온에서 permeabilization시킨다. 그 다음 PBS로 다시 세척하고 형광을 띄는 Alexa Fluor 488-phalloidin fluorescent Phalloidin (Invitrogen)으로 상온에서 20분간 염색한다. 염색된 세포는 공초점 레이저 현미경 (LSCM; Olympus Fluoview 300)으로 분석하였다.

8. 수상돌기가시 (Dendritic Spine) 밀도 측정 및 분석

공초점 레이저 현미경으로 찍은 신경세포의 Phalloidin 염색 사진에서 신경세포의 수상돌기 부위의 일정 길이 내에 존재하는

spine의 개수를 세어 평균값을 계산하여 대조군과 실험군의 차이를 비교하였다.

9. 통계처리

모든 결과는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 값으로 나타내었다. 모든 통계적 분석은 GraphPad Prizm 5를 사용하였고 그룹 간 비교는 one-way ANOVA의 Tukey's multiple-comparisons test를 이용하여 분석하였다. 통계학적인 유의성 분석은 p값이 0.05 이하 일 경우 유의미 하다고 판정하였다.

Part 2. 소포체 스트레스가 베타 아밀로이드 전구 단백질을 조절하는 기전 연구

1. 세포주 (Cell lines) 및 세포배양

세포는 CHO, 7w-PSML, HEK293 세포주를 사용하였고 0.1 mg/ml penicillin/streptomycin (P/S; Sigma, MO, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, UT, USA)이 포함된 Dulbesco' s modifiec Eagle' s medium (DMEM; Hyclone, UT, USA)에서 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 7w-PSML 세포는 wild type APP와 mutant PS (M146L)이 과발현 되어있는 CHO 세포로서 UC San Diego의 David Kang으로부터 제공 받았다.

2. 시약 및 시약 처리

A23187, thapsigargin, tunicamycin, MG132, lactacystin, bafilomycin, NH₄Cl, 3-methyladenine (3MA)는 sigma로부터 구입하였다. A23187, thapsigargin, tunicamycin은 12시간 동안 처리하였고 MG132, lactacytin, bafilomycin, NH₄Cl, 3MA는 다른 시약 처리 30분전에 미리 처리하였다.

3. Western Blot

실험한 방법은 Part 1의 것과 동일하고 사용한 1차 항체는 다음과 같다.

APP와 sAPP α 를 확인하기 위해서 각각 Anti-22C11 antibody

(Millipore), anti-6E10 antibody (Signet)를 사용하였다. 이외에 anti-sAPP β antibody (Covance), anti-HA antibody (Cell signaling), anti-USP25 antibody (Santa Cruz), anti-HRD1 antibody (Abgent), anti-Calnexin antibody (Enzo), anti- β -actin antibody 그리고 anti-tubulin antibody (Sigma-Aldrich)를 사용하였다.

4. 세포 생존도 측정

세포 생존도는 MTT 분석을 통해서 측정하였다. 시약 처리가 끝난 96well plate에 2.5 μ g/mL MTT가 포함 된 phenol red가 없는 배양액 50 μ l로 바꾸어 준 뒤 37°C에서 2시간 동안 배양한다. 이 후 140 μ l의 isopropanol을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하고 실온에서 30분간 둔 뒤 plate reader (POWER-XS; Bio-TEK)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

5. Transfection

CHO 세포는 60 mm 배양 접시에서 24시간 동안 키운 다음 lipofectamin LTX (Invitrogen)를 이용하여 HA-ubiquitin cDNA

발현벡터를 transfection하였다. Opti-MEM (Invitrogen)에서 cDNA와 transfection 용액을 상온에서 30분간 혼합한 뒤 Opti-mem으로 배양액을 갈아 준 CHO 세포에 첨가한다. 이 후 4시간 지난 다음 serum이 포함된 배양액을 기존 배양액 양만큼 첨가하고 다시 2시간 뒤에는 원래 세포 배양액으로 바꿔 준다.

6. 면역침강법 (Immunoprecipitation)

Ubiquitination이 된 APP를 확인하기 위해 면역침강법을 이용하였다. 시약 처리가 끝난 세포를 1% CHAPS buffer로 단백질을 추출한 다음 BCA로 정량 하여 400 μ g 의 단백질과 Flag antibody와 함께 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 protein A/G bead를 첨가하여 4℃에서 한 시간 동안 추가로 반응시킨다. 원심 분리하여 protein A/G bead를 가라앉힌 다음 bead만 남기고 조심스럽게 상층액은 버리고 4~5회 1% CHAPS로 세척하고 2xSB를 넣은 후 끓인 다음 western blot을 수행한다.

7. 면역세포염색 (Immunocytochemistry)

CHO 세포를 염색용 plate에서 키운 후 시약 처리하고 PBS로 세척한 후, 4% PFA로 실온에서 20분간 고정한다. 그리고 0.1% Triton X-100으로 permeabilization하고 5% BSA가 들어간 PBST로 blocking하였다. 이 후 1차 항체와 함께 4℃에서 overnight하고 세

척 한 다음 Alexa-fluorescent가 붙은 2차 항체를 실온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 다음 세척 하고 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 핵을 염색하고, 공초점 현미경으로 분석하였다.

8. 20S proteasome 활성 측정

20S proteasome 활성화는 20S proteasome activity assay kit (APT280, Millipore) 의 사용서를 참고하여 측정하였다. 간략하게, Proteasome에 의해 kit에 제공되는 기질인 LLVY-AMC가 형광을 띄는 7-amino-4-methylcoumarin (AMC)잘려지게 되면 그 형광을 측정하는 원리이다. Protein sample (20 μ M)을 37° C에서 proteasome substrate, LLVY-AMC, 와 반응시킨 이후 fluorometer (POWER-XS; BIO-TEK)를 이용하여 360/460nm에서의 흡광도를 측정하였다.

9. A β ELISA

7w-PSML 세포의 배양된 배양액으로부터 분리된 A β 40과 A β 42의 양을 sandwich ELISA kit (Human A β immunoassay kit ; IBL)를 사용하여 측정하였다. 시약 처리가 끝난 후 배양 된 배양액을 거둔 뒤 1500g로 5분간 4°C에서 원심분리 하여 세포 찌꺼기들을 제거하고 100 μ l를 측정에 사용하였다. 반응이 끝난 뒤에 ELISA plate reader (POWER-XS; Bio-TEK)를 이용하여 450nm에서

흡광도를 측정하여 분석하였다.

10. RNA 분리 및 Real-time PCR

HEK293 세포로부터 전체 RNA의 분리는 Qiagen RNeasy kit (Qiagen)을 이용하였다. 분리한 RNA는 정량 한 후 동일 양 ($2 \mu\text{g}$)을 Maxtime RT Premix_Oligo dT primer kit (intron biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 역전사 한 다음 cDNA로 변환하였다. 변환한 cDNA는 mRNA의 양을 확인하기 위해서 ABI stepone 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 Real-Time PCR을 수행하였다. Real-time PCR에 사용한 primer는 APP (forward : GCAGTGAGAAGAGTACCAAC / reverse : ACCTCATCACCATCCTCATC), actin (forward : AGCCTCGCCTTTGCCGA / reverse : CTGGTGCCTGGGGCG)이다. Actin gene은 endogenous 대조군으로 RNA의 양을 표준화하는데 사용하였다.

11. 통계처리

모든 결과는 mean \pm SEM 값으로 나타내었다. 모든 통계적 분석은 GraphPad Prizm 5를 사용하였고 그룹 간 비교는 one-way ANOVA의 Tukey's multiple-comparisons test를 이용하여 분석하였다. 통계학적인 유의성 분석은 p값이 0.05 이하 일 경우 통계적으로 유의미 하다고 판정하였다.

결 과

Part 1. 신경아교 전달물질인 ATP가 $A\beta$ 에 의한 시냅스 가소성 변화에 미치는 영향 연구

1. primary astrocyte와 U373 cell line에서 $A\beta 42$ 에 의한 ATP 분비 증가

성상교세포에서 자연히 발생하는 칼슘 진동은 성상아교 전달물질인 glutamate의 분비를 유도한다는 것이 알려져 있고 $A\beta$ 또한 배양된 성상교세포의 칼슘 신호전달의 파동을 방해한다는 보고가 된 바 있다 (33, 34). 따라서, $A\beta 42$ 처리가 1차 배양한 성상교세포와 성상교세포 세포주인 U373세포에서 ATP의 분비에 영향을 주는지 확인해 본 결과, U373 세포와 1차 배양 성상교세포에서 모두 $A\beta 42$ 처리 시 분비되는 ATP의 양이 증가되는 것을 확인 하였다 (그림 6A,B). 이를 통해 $A\beta 42$ 에 의해 활성화된 성상교세포로부터 성상아교 전달물질인 ATP의 분비가 증가된다는 것을 규명하였다.

2. $A\beta 42$ 에 의한 수상돌기 밀도 감소에 대한 ATP의 보호

효과

수상돌기 밀도는 시냅스 가소성, 학습 그리고 기억과 밀접한 관련성이 있기 때문에 (35) 1차배양 해마 신경세포에서 수상돌기 밀도에 대한 ATP의 효과를 알아보았다. 이전 보고에서 다양한 세포주와 조직에서 세포 밖의 ATP의 양이 nM에서 μ M까지 측정된다는 것이 알려진 바 있다 (36). 또한 ATP의 효과적인 반응 농도 (EC_{50} ; half maximal effective concentration)가 10μ M ~ 100μ M로 보고된 바 있어 본 실험에서는 10μ M의 ATP를 처리해 주었다 (37-39). 배양한 해마 신경세포에 $A\beta 42$ (2μ M)를 48시간 동안 처리한 뒤 수상돌기를 관찰 하기 위해 phalloidin으로 염색한 뒤 분석 한 결과, $A\beta 42$ 에 의해서 수상돌기의 밀도가 비교군과 비교했을 때 급격히 감소하는 것을 확인하였다 (그림 7). 반면 흥미롭게도 ATP (10μ M)를 $A\beta 42$ 처리하기 30분 전에 처리해준 그룹에서는 $A\beta 42$ 에 의해 감소되었던 수상돌기 밀도가 비교군 수준으로 회복되는 것을 관찰하였다. 이를 통해서 ATP가 $A\beta 42$ 에 의한 수상돌기 밀도 감소에 대한 보호적인 효과를 보임을 알 수 있었다.

3. $A\beta 42$ 에 의해 유도된 장기 상승 작용 (Long-term

potentiation; LTP) 감소에 대한 ATP의 회복 효과

LTP와 수상돌기 밀도는 시냅스 가소성과 관련 있다는 것이 알려져 있다 (40-42). 이전 연구들에서 합성한 $A\beta$ 의 처리가 *in vitro*와 *in vivo* 환경에서 해마의 LTP를 저해한다는 것이 보고되었다 (43, 44). ATP가 $A\beta$ 42에 의해 유도된 LTP 저해에 대해서 보호적인 효과를 보이는지 알아보기 위해 해마 절편을 이용하여 $A\beta$ 42 (200 nM)를 처리하여 LTP를 측정하였다. 해마 절편에 TBS (theta burst stimulation)로 LTP를 유도하였을 때 $A\beta$ 42가 처리된 조건에서는 이전 보고와 동일하게 LTP가 크게 저하된 것을 확인하였다 (그림 8). 그러나 $A\beta$ 42와 ATP를 함께 처리해 주었을 경우에는 $A\beta$ 42에 의한 LTP감소를 예방할 수 있었고, 이때 비교군 수준으로 LTP가 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 이 결과를 통해서 ATP가 $A\beta$ 42에 대하여 보호적인 효과를 할 수 있음을 알 수 있었다. 이런 ATP의 보호적인 역할은 TBS 처리 후 초기 (10분) 그리고 후기 (60분) 단계에서 모두 관찰하였다 (그림 8B, C). 다음으로 저농도 $A\beta$ 42 (200 nM)에서 LTP가 저하가 관찰된 것을 바탕으로 앞서 확인했던 수상돌기 밀도에 대한 효과를 저농도 $A\beta$ 42에서도 일어나는지 확인해본 결과, 예상했던 대로 저농도 $A\beta$ 42 처리에 의해서도 매우 급격하게 해마의 수상돌기

밀도가 감소되는 것을 확인하였고, 더불어 ATP의 보호적인 역할 또한 재확인하였다 (그림 8D-F). 이 결과를 통해서 ATP의 긍정적인 효과와 함께 $A\beta 42$ 가 저농도에서도 시냅스 활성화를 조절할 수 있음을 규명하였다. 본 실험은 포항공대 김정훈 교수님 연구실에서 수행하였다.

4. $A\beta 42$ 에 의한 시냅스 단백질들의 감소에 대한 ATP의 회복 효과를 해마 신경세포에서 규명

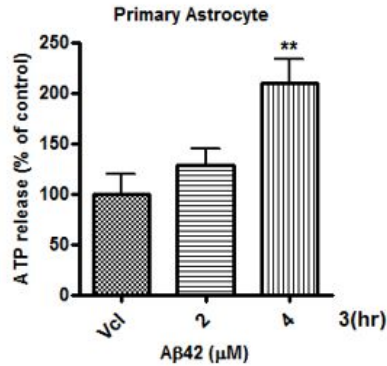
ATP가 $A\beta 42$ 에 의해서 감소한 LTP에 대하여 보호적인 기능을 한다는 것을 확인하였기 때문에 시냅스 가소성을 조절한다고 알려진 NMDA 수용체 (45, 46)와 뇌 특이적 구조단백질 (scaffolding protein)인 PSD-95와 같은 시냅스 단백질들의 양이 변화하는지를 알아보고자 하였다. PSD-95 단백질은 NMDA 수용체의 서브유닛인 NR2A와 NR2B와 상호작용하여 시냅스 신호전달과 가소성을 조절한다고 알려져 있다 (47, 48). NMDA 수용체 2A (NR2A)와 PSD-95의 양은 해마 신경세포 (21 DIV)에 $A\beta 42$ ($2\ \mu\text{M}$)를 48시간동안 처리했을 때 유의하게 감소하는 것을 확인 하였다 (그림 9A-C). 하지만 NMDA 수용체 1 (NR1)의 양은 변화되지 않았다. 그렇다면 ATP가 $A\beta 42$ 에 의해

시냅스 단백질이 감소된 신경세포를 보호할 수 있는지 알아보고자 $A\beta 42$ 를 처리하기 30분 이전에 ATP ($10\ \mu\text{M}$)을 처리하여 확인해 보았다. 그 결과 ATP를 $A\beta 42$ 처리하기 이전에 처리한 그룹에서는 $A\beta 42$ 처리시에 관찰하였던 NR2A와 PSD-95 단백질의 감소가 보이지 않음을 확인하였다 (그림 9). ATP는 생체 내에서 가수분해되어 adenosine과 같은 대사산물을 만들어 내기 때문에 앞서 확인한 ATP의 효과가 ATP의 효과인지 아니면 ATP의 대사산물에 의한 효과인지를 명확하게 규명하기 위해서 가수분해가 되지 않는 유사형 ATP (ATP analog)인 ATP γ S를 가지고 동일한 실험을 수행하였다. 실험결과, 해마 신경세포에 ATP γ S ($20\ \mu\text{M}$)를 $A\beta 42$ 처리 30분전에 처리하였을 때 ATP가 보여주었던 $A\beta 42$ 에 의한 NR2A와 PSD-95 단백질의 감소에 대한 보호효과가 동일하게 관찰됨을 확인하였다 (그림 9E, F). 따라서 이 결과를 토대로 ATP가 그것의 대사산물이 아닌 ATP 자체로 $A\beta 42$ 에 의해서 감소된 신경세포의 시냅스 단백질에 대한 보호적 기능을 함을 더욱 확실하게 증명할 수 있었다.

5. P2 purinergic 수용체를 통하여 ATP가 $A\beta 42$ 에 의한 시냅스 단백질들 감소에 대하여 보호 기능을 나타냄을 규명

세포 밖 ATP는 P2 유형의 purinergic 수용체를 통하여 세포 내 신호전달에 중요한 역할을 한다 (49). P2 purinergic 수용체는 다시 이온성 P2X 리간드 개폐형 이온 채널 (ligand-gated ion channel)과 대사성 P2Y G단백질 결합 수용체 (G-protein coupled receptor)로 나누어진다 (50, 51). 해마의 신경세포는 P2X와 P2Y purinergic 수용체 모두를 발현한다. PPADS는 선택적이지는 않으나 광범위하지도 않은 P2 수용체 길항제로서 P1 수용체를 억제하지는 않는다 (52, 53). ATP가 $A\beta$ 42에 의해 매개되는 시냅스 단백질들의 감소에 대한 보호 기작이 purinergic 수용체를 통한 신호전달에 의해 일어나는지 알아보려고 해마 신경세포에 ATP를 처리하기 전에 PPADS ($50\ \mu\text{M}$)를 처리하였다. 그 결과 ATP가 $A\beta$ 42에 의해 유도된 NR2A와 PSD-95와 같은 시냅스 단백질의 감소를 보호하더라도 (그림 9A) PPADS를 처리하는 조건에서는 ATP의 NR2A와 PSD-95 단백질에 대한 보호적인 효과가 억제되는 것을 확인하였다 (그림 10A, lane 4). 이 결과를 통해 ATP가 P2 유형의 purinergic 수용체 신호전달을 통해서 $A\beta$ 42에 의해 감소된 시냅스 단백질들을 보호함을 좀 더 명확하게 증명할 수 있었다.

A



B

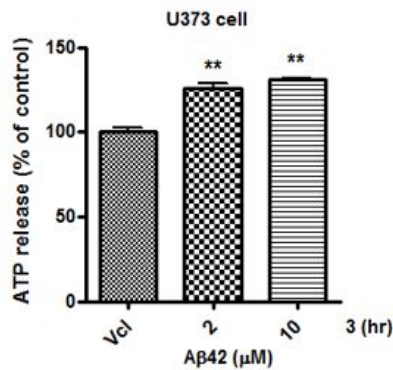


그림 6. Primary astrocyte 와 U373 세포주에서 Aβ42 처리 시 분비되는 ATP 측정

(A) Primary astrocyte 에 Aβ42 (2 또는 4 μM)를 3 시간 처리한 후 분비된 ATP 를 측정했을 때 4 μM 의 Aβ42 처리 시 유의하게 ATP 의 분비량이 증가함을 확인

(B)U373 세포주에 Aβ42 (2 또는 10 μM) 를 3 시간 동안 처리 시 분비되는 ATP 의 양이 증가함을 확인 배양된 배양액에 존재하는 세포밖으로 분비된 ATP 은 luciferin-luciferase assay 를 통해 측정하였다. 3 번의 독립적인 실험으로 분석함

**p<0.01 versus vehicle (control) group. Vcl, Vehicle

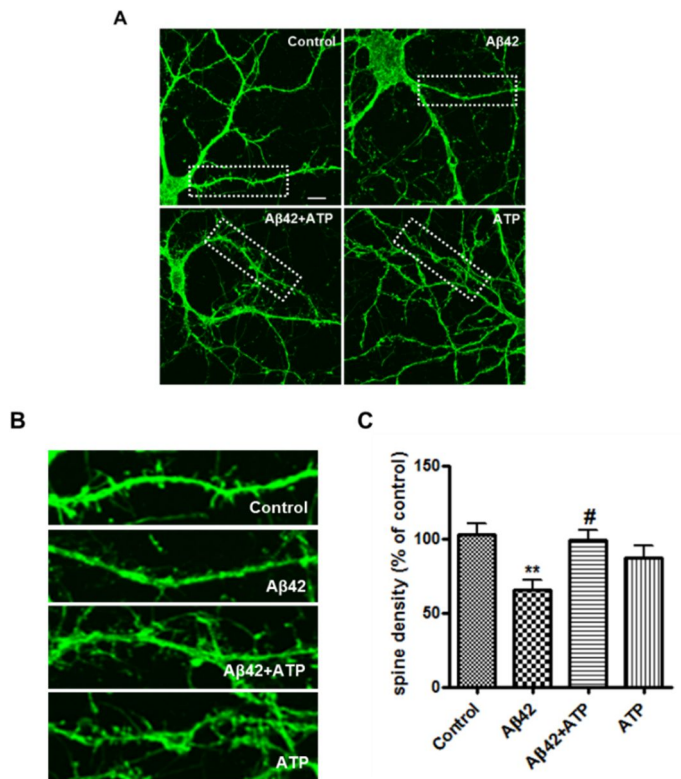


그림 7. primary rat hippocampal neuron 에서 $A\beta 42$ 에 의한 수상돌기가시 밀도의 감소에 대한 ATP 효과 규명

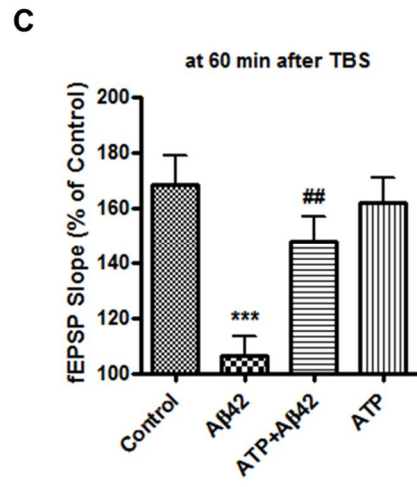
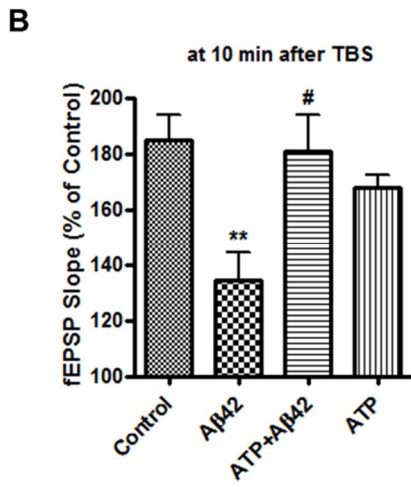
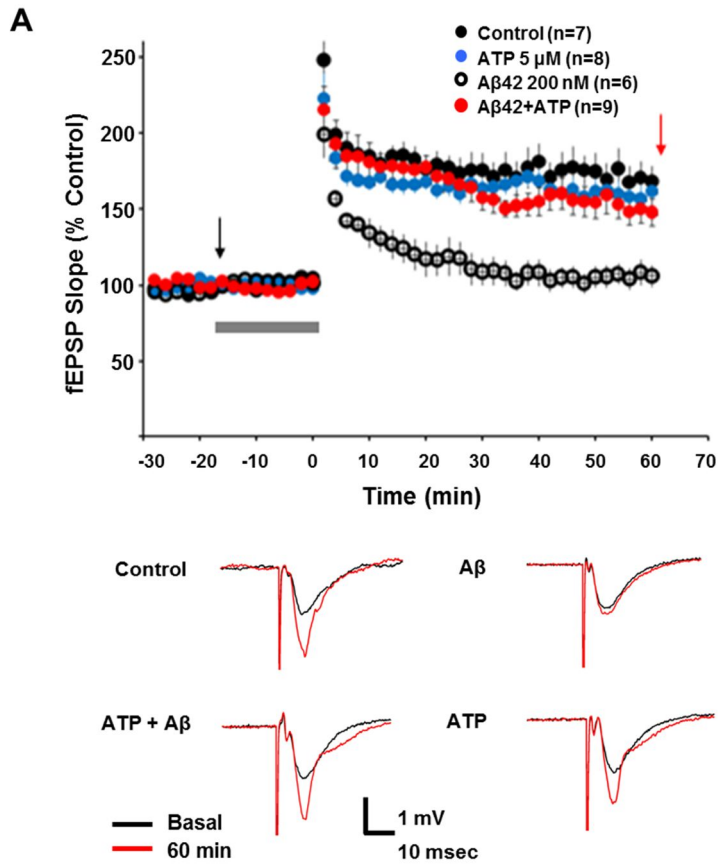
Primary rat hippocampal neurons (21 DIV) 에 $A\beta 42$ ($2\mu M$, 48시간)를 처리하기 30분 전에 ATP ($10\mu M$)를 처리 또는 미처리 하였다.

(A) 수상돌기가시를 관찰하기 위해 phalloidin Alexa-488 (녹색)을 이용하여 염색함

(B) 그림 7(A)에서 흰색 점선으로 표시한 영역을 확대한 이미지

(C) 수상돌기 분절 내 수상돌기가시의 수를 정량화

** $p < 0.01$ versus vehicle (control) group; # $p < 0.05$ versus $A\beta 42$ 처리군. Scale bar, $10\mu m$.



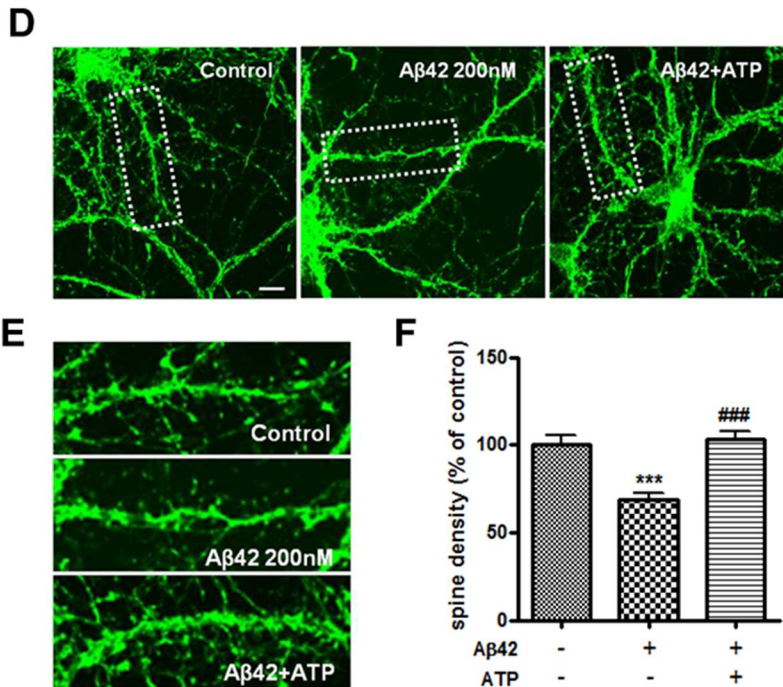


그림 8. 해마절편에서 Aβ 42에 의한 LTP 저하에 대한 ATP의 효과 규명

(A) fEPSPs는 해마의 CA1 부위에서 측정

Aβ 42 (200 nM)는 TBS로 유도한 LTP를 저해하는 반면 ATP (5 μM)와 함께 처리시에는 Aβ 42에 의한 LTP 저해를 보호함. 각각의 fEPSP slope (상) fEPSP 그래프 (상)에서 검정과 빨강색 화살표로 표시한 시간대의 LTP의 평균 값을 나타내는 trace (하) 회색막대는 TBS처리 전 20분 동안 aCSF (control) 또는 시약 (Aβ 42, Aβ 42+ATP, ATP)를 주입한 시간을 나타냄

(B, C) TBS 처리 후 각각 10분 (B)과 60분 (C) 때의 fEPSP 측정. * $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ versus control group; # $p < 0.05$

versus A β 42처리군

(D) 저농도 A β 42 (200 nM)가 수상돌기가시 밀도에 미치는 영향
확인

Primary rat hippocampal neurons (21 DIV)에 A β 42를 48시간
동안 처리하기 30분전에 ATP를 처리 또는 미처리함 Phalloidin
Alexa-488 (녹색)으로 수상돌기가시 염색함

(E) D에서 점선으로 표시한 지역의 확대 이미지. *** $p < 0.001$
versus vehicle (control) group; ### $p < 0.001$ versus A β 42
처리군. Scale bar, 10 μ m.

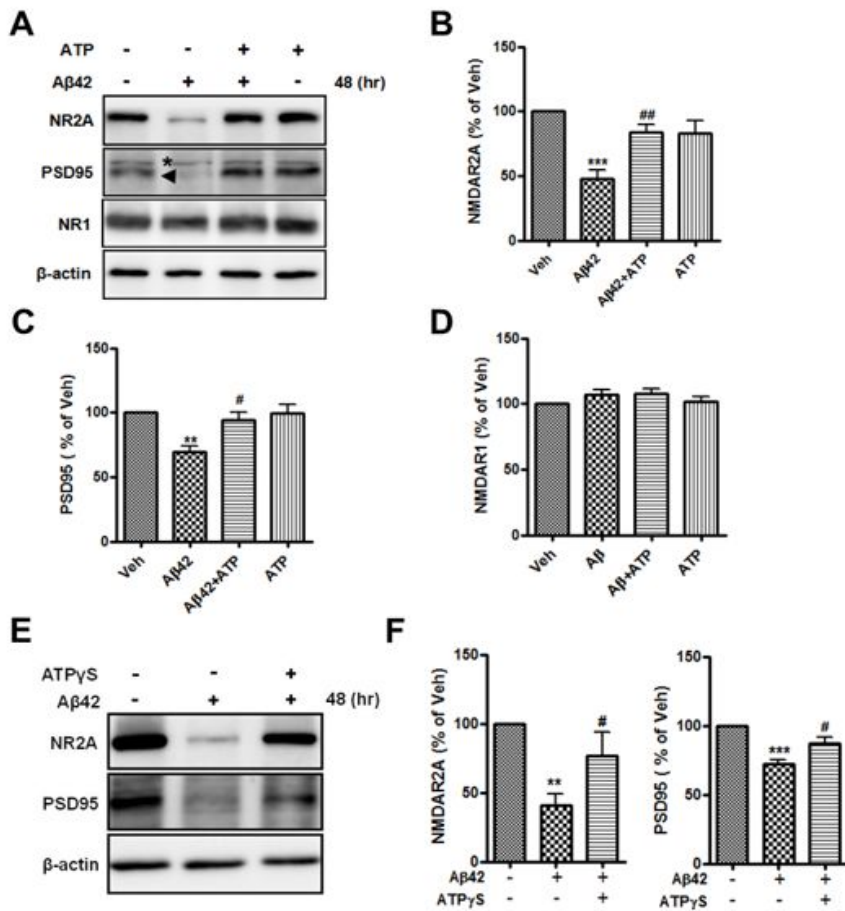


그림 9. Primary hippocampal neurons에서 A β 42에 의해 감소한 시냅스 단백질에 대한 ATP 효과 확인

Primary hippocampal neurons (21 DIV)에 A β 42를 48시간동안 처리하기 30분전에 ATP를 처리 또는 미처리함

(A) Western blotting을 통해서 NR2A, PSD-95, NR1의 양을 확인함 β -actin은 loading control로 사용. 화살촉은 PSD-95를 나타내고 별표는 비 특이적인 밴드를 나타냄

(B-D) NR2A (B), PSD-95 (C), 그리고 NR1 (D)의 정량화 $A\beta$ 42에 의해 감소한 NR2A와 PSD-95의 양이 ATP의 전 처리에 의해 보호되는 반면 NR1은 변화 없음을 확인 $**p<0.01$, $***p<0.001$ versus vehicle (Veh; control) group (n=6); $\#p<0.05$, $\#\#p<0.01$ versus $A\beta$ 42 처리군 (n=6).

(E) $A\beta$ 42에 의한 시냅스 단백질 감소에 대한 ATP γ S (20 μ M)의 효과 $**p<0.01$, $***p<0.001$ versus vehicle (control) group; $\#p<0.05$ versus $A\beta$ 42 처리군

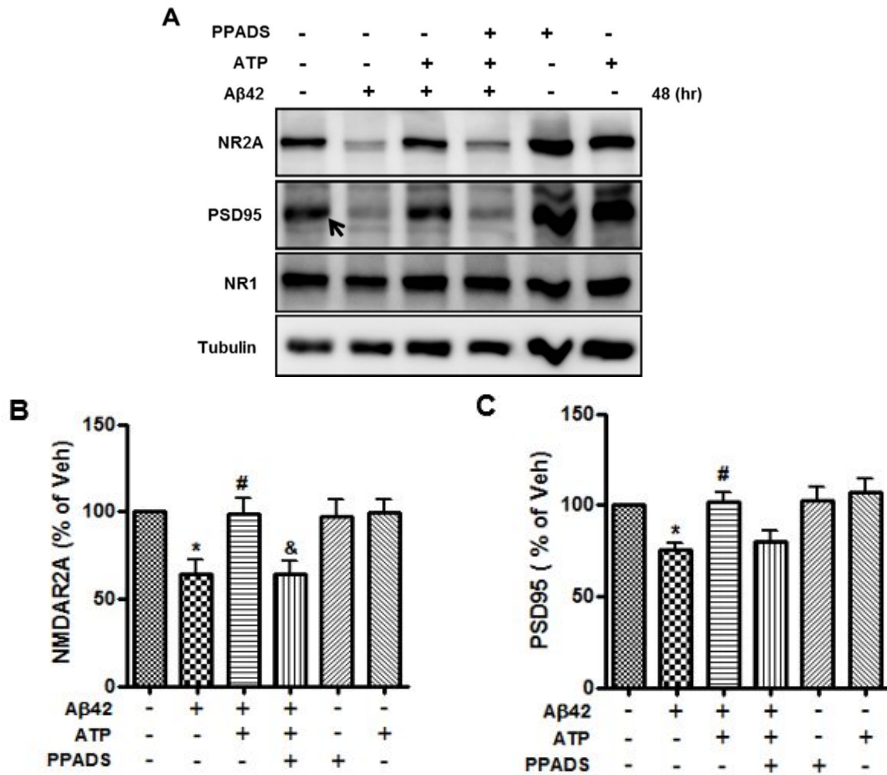


그림 10. A β 42 에 의해 감소되는 시냅스 단백질에 대한 ATP 의 효과가 P2 purinergic 수용체를 통합을 PPADS 를 이용하여 규명 (A) Primary hippocampal neurons 에 A β 42 (2 μ M) 처리하기 30 분 전에 ATP 를 PPADS (50 μ M ; P2 purinergic 수용체의 길항제)와 함께 처리 하거나 단독으로 처리함 Western Blot 을 수행하여 NR2A, PSD-95, NR1 의 양을 확인함. 화살표는 PSD-95 의 특이적인 밴드를 나타냄. Tubulin 은 loading control 로 사용함

(B, C) NR2A (B) 와 PSD-95 (C)의 western blot 결과로부터 정량화 *p< 0.05 versus vehicle (Veh) group; #p<0.05 versus A β 42 처리군; &p<0.05 versus A β 42 와 ATP를 함께 처리한 군

Part 2. 소포체 스트레스가 베타 아밀로이드 전구 단백질을 조절하는 기전 연구

1. 세포 내 칼슘 증가가 APP 단백질의 대사과정에 미치는 효과

A23187 은 잘 알려진 칼슘 ionophore 로 세포 내 칼슘을 증가시키기 위한 목적으로 실험에 널리 사용되는 시약이다. 칼슘 스트레스가 APP 대사과정에 영향을 주는지 알아보하고자 7w-PSML 세포에 A23187 ($1\mu\text{M}$)을 12 시간동안 처리하였다. 7w-PSML 세포는 야생형 (wild type) APP 와 돌연변이형 (mutant) presenilin-1 (M146L)을 안정적으로 발현 하고 있는 Chinese hamster ovary (CHO) 세포이다. 그러므로 이 세포는 APP 와 함께 APP 의 대사 산물인 $A\beta 40$ 과 $A\beta 42$ 를 관찰하기에 효과적인 세포이다. A23187 을 처리한 7w-PSML 세포는 APP 를 포함하여 sAPP α , sAPP β 가 50% 이상 비교군과 비교하여 감소한 것을 확인하였다 (그림 11A, B). $A\beta 40$ 과 $A\beta 42$ 의 양도 A23187 처리시 매우 크게 감소하는 것을 관찰하였다 (그림 11C). 게다가 낮은 농도의 A23187 (500 nM)과 시약 처리 후 짧은 시간 이내에 APP 가 매우 급격히 감소함을 확인하였다 (그림 11D). A23187 의 세포 독성 효과를 확인하기 위해 MTT 분석을 해본 결과, A23187 은 세포 생존력에 영향을 주지 않으며 앞서 실험한

조건 하에서는 세포 독성을 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다 (그림 11E). 이는 A23187 에 의한 APP 의 감소가 세포 죽음에 의한 결과는 아님을 증명할 수 있다. 그렇다면 APP 의 감소가 전사단계에서 조절되는지를 알아보하고자 A23187 을 처리한 다음 real-time RT-PCR 을 수행하여 APP 의 mRNA 양을 확인하였다. 그 결과 A23187 을 처리한 그룹과 비교군 사이에 APP mRNA 양은 차이가 나이지 않음을 관찰함으로써 A23187 처리에 의한 세포 내의 칼슘증가는 APP 의 mRNA 가 아닌 단백질 양을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 이 결과는 APP 가 세포 내 칼슘 증가에 의해서 전사 후 단계에서 하향조절 됨을 시사한다.

2. 소포체 스트레스로 인한 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 통한 APP 의 분해 확인

APP mRNA 가 A23187 처리시에 변하지 않았기 때문에 APP 단백질 감소의 원인이 프로테아좀에 의한 분해의 결과인지를 확인해보기 위하여 A23187 처리 30 분 전에 프로테아좀 저해제인 MG132 ($10\mu\text{M}$)을 처리한 다음 APP 단백질의 양을 관찰하였다. 그 결과, A23187 처리에 의해 급격히 줄어들었던 APP 가 MG132 가 처리 된 조건에서는 비교군과 흡사한 수준으로 APP 가 감소하지 않았음을 확인하였다 (그림 12A). 이런 관찰을 좀 더 명확히 확인하기 위해 MG132 보다 좀 더 특이적으로 26S

프로테아좀의 활성을 저해할 수 있는 lactacystin ($10\mu\text{M}$)을 처리하여 APP의 양을 비교해보았다. Lactacystin의 처리에 의해서도 마찬가지로 A23187 처리시에 감소했던 APP의 양이 보호됨을 확인함으로써 세포 내 칼슘증가로 인한 소포체 스트레스가 프로테아좀을 통한 APP의 분해를 야기함을 알 수 있었다. 세포 내 칼슘증가로 인한 소포체 스트레스가 APP의 분해를 유도한다는 것을 증명하기 위한 다른 실험으로 소포체 스트레스를 발생시킨다고 알려진 소포에 칼슘 펌프의 저해제인 thapsigargin과 단백질 글로코실화 저해제인 tunicamycin을 이용하였다. 이 thapsigargin과 tunicamycin 처리시 A23187 처리시와 동일하게 APP가 감소하는 것을 보았고 이런 감소는 프로테아좀의 저해시 회복됨을 확인하였다 (그림 12B, C). A23187과 thapsigargin은 모두 세포 내 칼슘을 증가시키고 그로 인해 소포체 스트레스를 유발하기 때문에 세포 내 증가된 칼슘이 APP의 감소에 영향을 끼치는지 확인하고자 칼슘 킬레이터인 BAPTA/AM을 이용하였다. 칼슘 킬레이터 처리시 ionophore에 의한 APP의 감소에 대한 보호 효과를 확인하였고 (그림 12D), 이 결과들은 망가진 칼슘 항상성을 포함한 소포체 스트레스가 프로테아좀을 통해서 APP의 분해를 유도함을 확인하였다.

3. 소포체 스트레스에 의한 APP 분해가 프로테아좀 특이적 경로를 통함을 확인

포유동물의 세포에서 오토파지와 유비퀴틴-프로테아좀 시스템 (UPS)은 세포 내 단백질 분해를 위한 대표적인 경로로 잘 알려져 있다 (54). APP의 분해가 소포체 스트레스 상황에서 UPS를 통한 것인지를 확인하기 위해서 세포 내 여러 가지 단백질 분해 경로의 저해제들을 이용하였다. 7w-PSML 세포에 오토파지 저해제인 3MA (3-methyladenine)와 리소좀 기능 저해제인 bafilomycin A1 과 ammonium chloride (NH_4Cl)를 처리한 이후 30 분 뒤에 A23187 을 처리한 뒤 APP의 양을 확인 해 보았다. 흥미롭게도 칼슘 ionophore에 의해 야기된 APP의 분해가 오직 프로테아좀 저해제인 MG132 처리 조건에서만 보호 되는 것을 관찰하였다 (그림 13).

4. 칼슘 과부하에 의한 APP의 폴리유비퀴틴화 확인

UPS를 통한 APP의 분해를 확인하였고 실제로 칼슘 ionophore 처리 시 프로테아좀의 활성화가 변화하는지를 측정해보았다. 칼슘 ionophore 처리시 비교군에 비해서 20% 가량 20S 프로테아좀의 활성이 유의하게 증가하였음을 확인하였다 (그림 14A). 프로테아좀을 통한 단백질의 분해는 반드시 분해 될 단백질의

폴리유비퀴틴화 (poly-ubiquitination)가 동반되어야 하기 때문에 APP 도 이런 규칙을 따르는지를 알아 보기 위해 CHO 세포에 HA 태그가 붙어있는 유비퀴틴을 트랜스펙션 (transfection)한 다음 프로테아좀 저해제인 MG132 를 ionophore 를 처리하기 30 분전에 처리 한 뒤 ionophore 는 12 시간동안 처리하였다. 이후 면역침강법으로 확인한 결과, 프로테아좀 저해제를 사전 처리한 조건에서 폴리유비퀴틴화가 된 APP 를 관찰하였다 (그림 14B). 따라서 실제로 APP 가 칼슘 과부화로 인한 소포체 스트레스로 인해 폴리유비퀴틴화 되어 프로테아좀을 통해 분해 됨을 규명하였다.

4. 소포체 스트레스로 인한 APP 분해와 소포체 연관 단백분해 과정 (ER-associated degradation; ERAD)의 관련성 확인

소포체 스트레스 상황 동안 세포 내에서 작동되는 주요한 보호적인 또는 보충 기전으로 알려진 것은 ‘접히지 않은 단백질 반응’ (unfolded protein response, UPR)이다 (55, 56). UPR 은 소포체 연과 단백분해 과정 (ER-associated degradation; ERAD)과 관련 있는 단백질들의 발현증가를 통해 ‘잘 못 접힌 단백질’ (misfolded protein)의 분해를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 다음으로 소포체 스트레스가 ERAD 와 관련 된 단백질들의 양에 영향을 주는지 확인한 결과 APP 와 USP25 (ubiquitin-specific protease 25)는 ionophore 또는 tunicamycin 처리시 감소한 반면에 HRD1

(human homolog of yeast Hrd1p/Der3p)과 BiP (binding immunoglobulin protein)은 증가하였다 (그림 15A). USP25 는 탈유비퀴틴 효소이고 HRD1 은 ERAD 관련 E3 유비퀴틴 접합 효소 (E3 ubiquitin ligase)이다. 이전 보고에서 APP 는 HRD1 의 기질 중의 하나임이 밝혀진 바 있다 (57). 따라서 탈유비퀴틴 효소인 USP25 와 APP 사이의 상호작용을 확인해보기 위해서 면역침강법을 이용한 결과, APP 가 USP25 와 결합하는 것과 함께 ionophore 처리 이후에 두 단백질 사이의 결합이 감소하였음을 확인하였다 (그림 15B). 또한 USP25 가 과발현 된 조건에서 A23187 처리에 의한 APP 의 감소가 회복되는 경향성을 확인하였고 (그림 15C) 이 같은 결과들을 통해 소포체 스트레스로 인한 ERAD 의 활성화가 APP 의 분해를 야기하고 USP25 는 proteasome 을 통한 APP 의 분해를 보호할 수 있음을 확인하였다.

5. 소포체 스트레스 상황에서 프로테아좀의 저해는 소포체에서 APP 의 축적을 초래함을 확인

APP 는 소포체에서 생성된 뒤 골지로 이동하기 때문에 소포체 스트레스를 유도한 상황에서 APP 가 소포체에 축적되는지를 면역세포염색법을 사용하여 확인하였다. 소포체를 관찰하기 위해서

소포체 표지 단백질인 calnexin 을 염색하였다. A23187 을 처리한 CHO 세포는 앞에서 확인한 결과와 동일하게 APP 의 염색강도가 비교군과 비교했을 때 감소해 있음을 확인하였고 lactacystin 을 처리하여 프로테아좀을 저해한 조건에서는 A23187 을 처리하게되면 calnexin 과 APP 의 염색 신호가 겹치는 강도가 증가하는 것을 확인하였다 (그림 16). 이 실험결과는 프로테아좀 저해제인 lactacystin 에 의해서 소포체 스트레스로 인한 APP 의 분해가 저해되면서 소포체에 APP 가 축적됨을 보여주고 있다. 소포체는 세포 내 $A\beta$ 생성장소로서의 역할을 하고 있으므로 이 결과를 바탕으로 소포체에서의 비정상적인 APP 의 축적은 $A\beta$ 생성의 원인이 될 수 있음을 시사한다.

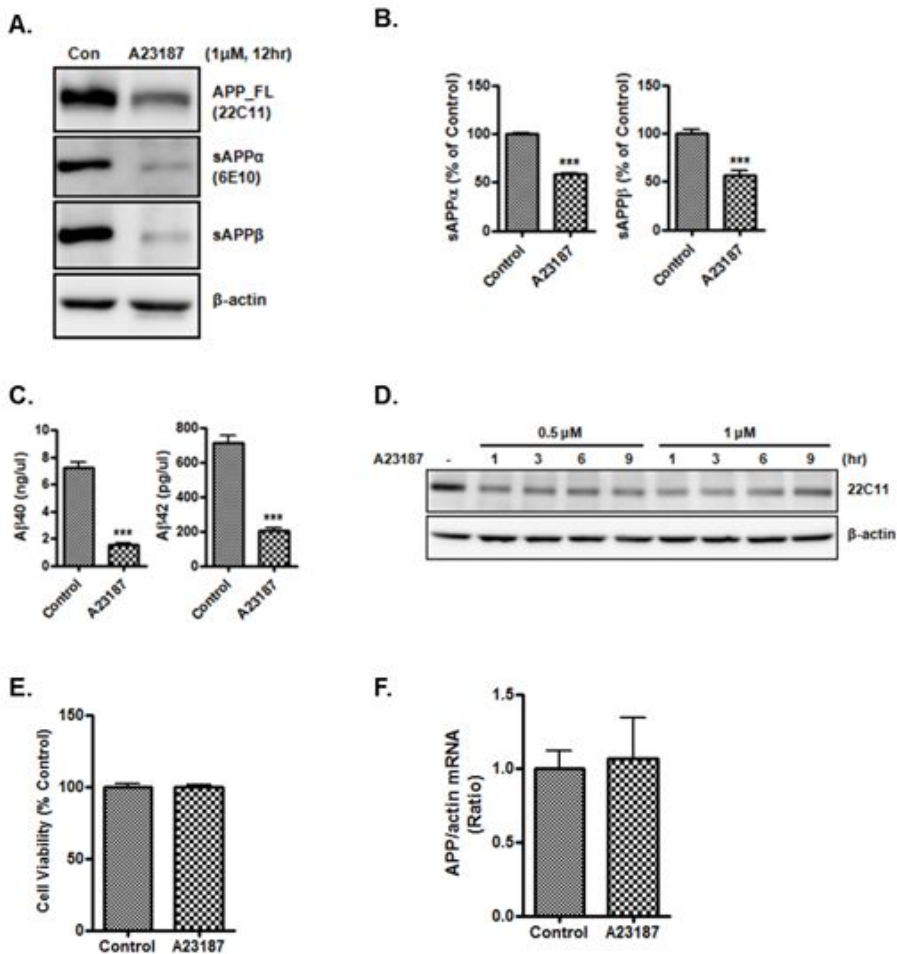


그림 11. 세포 내 칼슘증가가 APP 대사과정에 미치는 영향 확인

7w-PSML 세포주에 A23187 (1 μ M)을 12시간동안 처리함

(A) 전체 단백질을 얻은 뒤 각각의 항체를 이용하여 western blot을 수행하여 단백질의 양을 확인함

(B) Western blot 결과를 통한 sAPP α (6E10 항체)와 sAPP β 의 정량화

(C) 시약 처리 후 배양된 배양액을 이용하여 ELISA로 A β 40과 A β 42의 양을 측정함

(D) 7w-PSML 세포주에 A23187 처리 시 다양한 시간과 농도를

사용한 뒤 western blot을 통해 APP의 양을 확인

(E) 세포의 생존력 (Cell viability)을 MTT 분석방법을 통해 확인한 결과 A23187 처리 시 세포 생존력에는 영향이 없음을 확인함

(F) 전체 APP mRNA양은 A23187 처리시 변화 없음을 RT-PCR을 통해 확인함 (N=4, ***P < 0.001 versus 대조군)

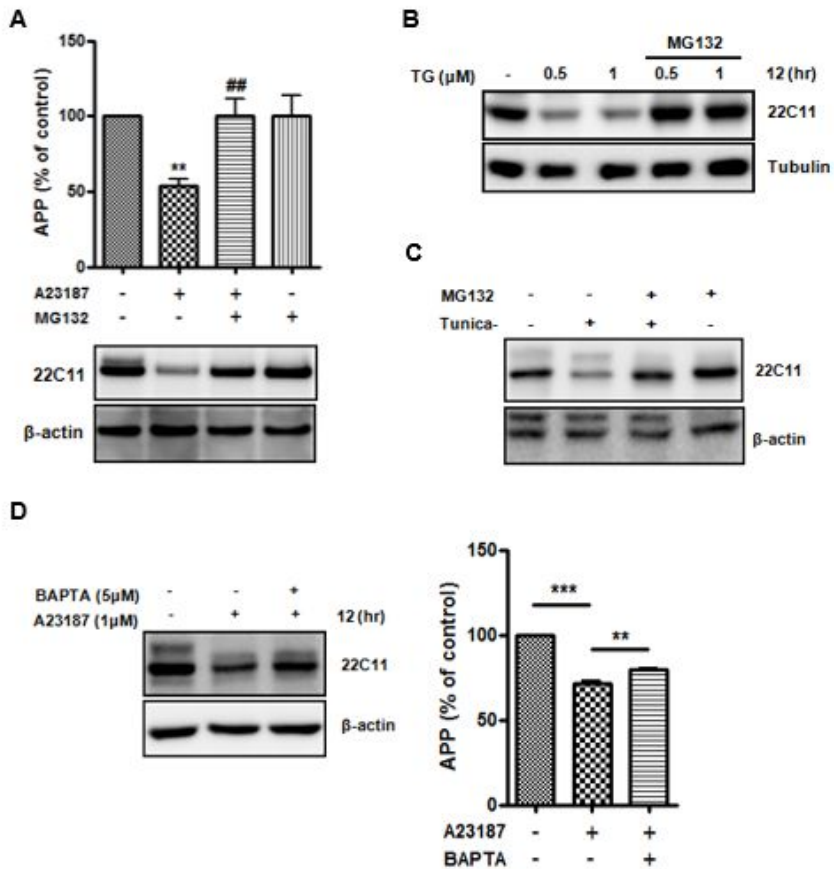


그림 12. 소포체 스트레스가 APP의 분해를 유도함을 확인

(A) 7w-PSML 세포주에 A23187 (1 μM 12 h)을 처리하기 30분 전에 10 μM MG132 (proteasome 저해제)를 처리 또는 미처리하였다. 시약 처리 후 전체 단백질을 얻어 western blot을 수행하여 APP (22C11)의 양을 확인함 아래 영역은 western blot 이미지 위쪽 영역은 이미지상의 농도계를 이용하여 APP의 양을 정량화한 그래프

(B, C) MG132 (proteasome 저해제)의 전 처리가 소포체 스트레스에 의한 APP의 분해를 보호함 7w-PSML 세포주에

thapsigargin (B) 또는 tunicamycin (C)을 12시간 동안 처리하기 30분전에 MG132를 처리하고 시약 처리가 끝난 뒤 western blot을 수행하여 APP (22C11)의 양을 확인함

(D) 7w-PSML 세포주에 A23187 ($1\ \mu\text{M}$)을 12시간 동안 처리하기 한 시간 전에 BAPTA/AM ($5\ \mu\text{M}$)을 처리하고 western blot을 이용하여 APP의 양을 확인 BAPTA를 통해 세포 내 칼슘을 킬레이션했을 때 APP의 분해가 보호됨을 확인 (N=4, ***P < 0.001 and **P < 0.05)

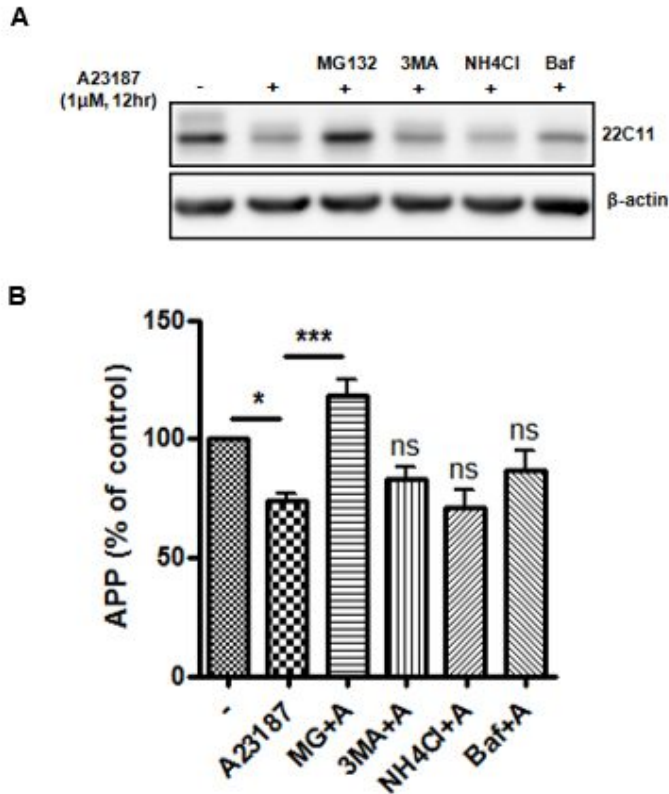


그림 13. APP 가 소포체 스트레스 상황에서 APP 가 프로테아좀에 특이적인 경로를 통해서 분해됨을 확인

(A) 7w-PSML 세포주에 A23187 ($1 \mu\text{M}$, 12 h)을 처리하기 30 분 전에 $10 \mu\text{M}$ MG132 (proteasome 저해제), 1 mM 3MA (세포자식작용, autophagy, 저해제), 20 mM NH_4Cl 또는 10 nM Bafilomycin (Baf) (Lysosome 저해제)를 처리함 Western blot 을 수행하여 APP 의 양을 확인함 β -actin 은 loading control 로 사용함

(B) Western blot 결과에서 APP 단백질량의 정량화 ($N=4$; $*P < 0.05$, $***P < 0.001$)

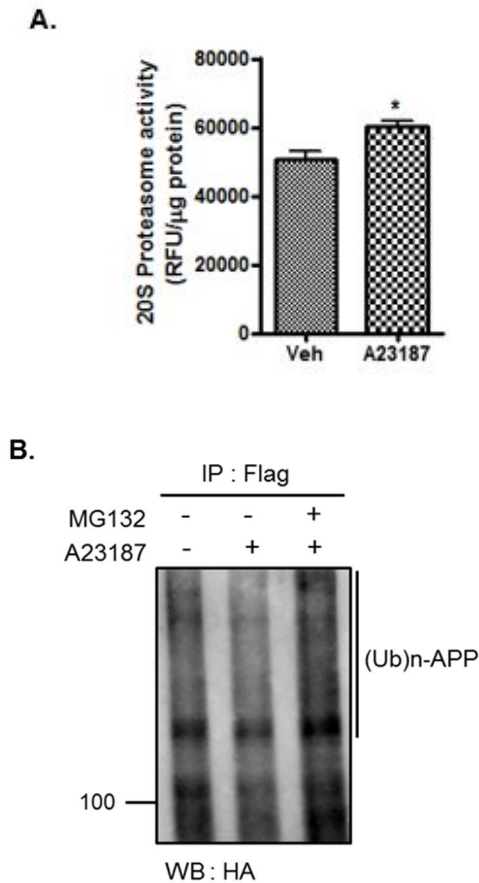


그림 14. 세포 내 칼슘 증가에 의한 APP의 유비퀴틴화 확인

(A) CHO 세포주에 A23187 (1 μ M)을 12 시간 동안 처리 한 후, 20S proteasome activity kit (APT280; Millipore)를 사용하여 proteasome activity 를 측정함 (N=4. *P < 0.05 versus 대조군)

(B) CHO 세포주에 HA-tagged ubiquitin (Ub-HA)과 Flag-tagged APP 를 co-transfection 하고 24 시간이 지난 후, 12 시간동안 A23187 을 처리하기 30 분 전에 MG132 를 처리 혹은 미처리 하였다. 전체 단백질을 얻은 후에 Flag 항체를 이용하여 면역침강을 하고 HA 항체로 western blot 함

(C) CHO 세포주에 USP25 을 transfection 하거나 하지 않은 조건에서 A23187 을 12 시간 동안 처리한 다음 전체 단백질을 얻은 뒤 western blot 을 수행하여 APP 의 양을 정량함 (N=2. *P < 0.05 versus 대조군)

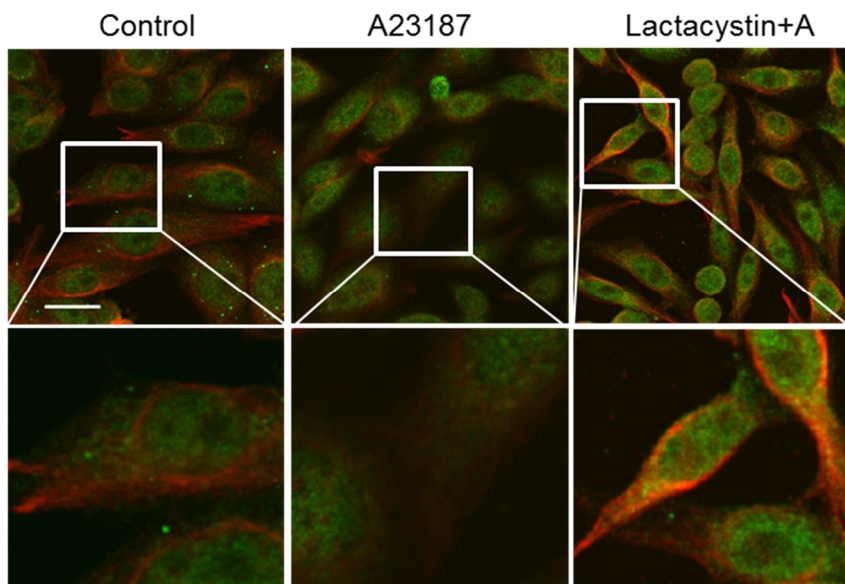


그림 16. 소포체 스트레스 상황에서 프로테아좀 저해 시 APP가 소포체에 축적됨을 확인

CHO 세포주에 A23187 을 12 시간동안 처리하기 30 분 전에 lactacystin (proteasome 활성 저해제)을 처리 또는 미처리함 시약 처리가 끝난 뒤 22C11 (APP)과 calnexin 항체로 각각 APP 와 소포체를 염색하고 Alexa 594 와 Alexa 488 이 결합된 이차 항체를 이용한 뒤 공초점 현미경으로 관찰함 Scale bar; 20 μ m

고 찰

Part 1. 신경아교 전달물질인 ATP가 $A\beta$ 에 의한 시냅스 가소성 변화에 미치는 영향 연구

본 연구는 신경아교 전달물질 중의 하나인 ATP가 $A\beta$ 에 의해 유도된 시냅스 가소성의 저해에 반하는 역할을 수행할 수 있다는 여러 중요한 증거를 제공한다. 첫째로, $A\beta$ 42가 1차배양 성상교세포와 U373 세포주에서 ATP의 분비를 증가시킴을 확인하였다. 둘째, ATP는 1차배양 해마 신경세포에서 $A\beta$ 42로 인한 수상돌기가시 밀도의 감소에 대한 보호기능을 한다. 셋째, ATP는 해마 절편에서 $A\beta$ 42에 의한 LTP의 붕괴를 회복시킨다. 넷째, ATP는 $A\beta$ 42로 인한 시냅스 단백질들의 감소를 P2 purinergic 수용체를 통하여 회복시킨다. 이런 여러 가지 결과들은 $A\beta$ 42에 의해 유도된 시냅스 가소성의 장애에 대하여 ATP가 보호 기능 갖는다는 사실을 뒷받침 할 수 있는 다양한 증거들을 제공한다. $A\beta$ 독성과 연관된 신경세포의 죽음과 관련된 이전 연구들은 일반적으로 신경세포에만 제한적으로 연구되었다. 우리 뇌의 중추신경계를 구성하고 있는 가장 많은 신경교세포는 성상교세포이다. 성상교세포는 원래 신경세포를 구조적으로

지지하는 수동적인 역할만이 알려져 있었지만 지난 10년간 여러 연구들을 통해서 성상교세포가 시냅스 가소성을 포함한 신경세포의 기능에 능동적이고 직접적인 역할을 할 수 있다는 다수의 견해들이 보고되었다. 하지만 중추신경계에서 성상교세포의 중요성에도 불구하고 신경세포와 성상교세포간의 상호작용에 대한 분자적 기전에 대한 것은 많이 알려지지 않았다. 성상교세포에서의 칼슘 신호전달은 뇌에서 성상교세포와 신경세포 사이의 상호통신에 있어 중요한 역할을 수행한다 (58). 신경세포의 망가진 칼슘 항상성은 알츠하이머병의 두드러진 특징으로서 $A\beta$ 는 신경세포의 세포 내 칼슘 항상성을 크게 망가뜨릴 수 있다. 몇몇 최근의 연구들에서 $A\beta$ 가 성상교세포의 칼슘 신호전달 및 성상아교 전달물질의 분비를 변화시키는 것이 보고되었다. 2009년 Kuchibhotla 그룹은 $A\beta$ 플라크를 포함하고 있는 APP/PS1 형질전환 알츠하이머병 모델 마우스의 뇌의 성상교세포에서 칼슘 파동이 관찰됨을 보고하였다 (59). 또한 $A\beta_{25-35}$ 를 처리한 미세아교세포와 성상교세포에서 glutamate와 ATP의 분비가 증가되는 것을 관찰한 보고도 된 바 있다 (60). 그러므로 $A\beta_{42}$ 에 의해 유도된 성상교세포의 ATP분비는 잘 못 변화된 성상교세포의 칼슘 진동때문일 가능성이 있다 (그림 6). 본 연구에서 확인한 $A\beta_{42}$ 에 의해 유도된 LTP의

저하는 이전 여러 연구들에서 보고되었다 (61-63). 그래서 본 연구에서는 ATP가 A β 42 처리 조건에서 저하된 LTP를 보완할 수 있는지를 확인해보았고 그림 8에서 보는 것처럼 A β 42 처리에 의해 감소된 LTP가 ATP로 인해서 회복되는 것을 관찰하였다. 수상돌기가시의 형성은 신경세포의 시냅스 가소성과 LTP와 매우 밀접하게 관련되어 있기 때문에 수상돌기가시의 밀도에 대한 ATP의 효과를 확인해보고자 하였다. 하지만 성상교세포를 배양한 배양액에는 ATP를 포함한 glutamate, 조기 면역관련 cytokine 및 chemokine들과 같은 매우 다양한 물질을 포함하고 있기 때문에 성상아교 전달물질인 ATP의 신경세포에 대한 독립적인 효과를 연구하는 것은 실험적인 기술에 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 glutamate와 여러 면역관련 물질들을 포함한 여러 가지 성상교세포로부터 유래한 다른 인자들의 효과들을 배제하고 순수한 ATP만의 효과를 연구하기 위해 1차배양 신경세포에 세포밖에서 합성된 ATP를 처리하는 방법을 사용하였다. 이 같은 방법으로 A β 42에 의해 감소된 수상돌기가시 밀도 또한 유의하게 ATP의 처리로 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 이와 같은 결과들을 바탕으로 A β 42에 의해 망가진 시냅스 가소성에 대한 ATP의 보호적인 기능을 규명할 수 있다. NMDA 수용체는 시냅스 가소성과

기억에 관련한 기능을 조절하는 주요 물질로 잘 알려져 있다. NMDA 수용체는 각각 두 개의 NR1과 NR2 서브유닛으로 구성된 heterotetramer 복합체로 (64-66) 알츠하이머병의 병리생리학적인 면에서 중요한 역할을 한다 (67). NR2A와 NR2B는 NMDA 수용체 서브유닛의 주된 유형이다. 시냅스 후 구조 단백질인 PSD-95는 PSD-95/discs large/zona occludens-1이라는 도메인을 통해서 NMDA 수용체의 서브유닛 중의 하나인 NR2A와 결합한다고 알려져 있기 때문에 (68) NR2A와 PSD-95의 변화는 유사한 형태로 관찰 될 것으로 예상하였다. 예상한 것처럼 $A\beta 42$ 처리시 동시에 감소한 NR2A와 PSD-95는 ATP에 의해서 다시 또 회복되는 것을 확인하였다 (그림 9). 본 연구에서는 시냅스 신호전달에 필요한 시냅스 소낭 당단백질인 synaptophysin 또한 $A\beta 42$ 에 의해서 감소되었다가 ATP에 의해서 보호되는 결과를 1차 배양 해마 신경세포에서 관찰하였다. 세포 밖의 ATP는 P2 purinergic 수용체와의 결합을 통해서 다양한 세포 내 과정들을 조절할 수 있는 신호로서 작용한다 (69). P2 purinergic 수용체는 7개의 리간드 개폐형 이온 채널인 P2X 수용체 서브유닛 (P2X₁₋₇) (70)과 8개의 대사형 G단백질 결합 수용체인 P2Y 수용체 (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14})로 구성되어있다 (36). P2X 수용체 서브유닛은

신경교세포뿐만 아니라 신경세포까지 두루 발현한다 (70, 71). P2X 수용체는 ATP에 대한 빠른 시냅스 반응을 매개하는 반면에 P2Y 수용체는 신경세포의 막전위의 느린 변화를 가져온다 (69, 72-74). 1차배양 해마 신경세포에 PPADS를 처리했을 때, ATP는 A β 42에 의한 시냅스 단백질들의 감소를 보호하지 못하였다 (그림 10). 이 결과는 신경세포에 대한 ATP의 보호기능이 P2 수용체를 통해 일어나는 것임을 시사한다. *In vitro*상에서 PPADS는 heteromeric P2X_{2/3} 과 P2X_{1/5} 수용체뿐만 아니라 homomeric P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅, P2Y₁ 수용체에 대한 저해효과를 나타낸다. 하지만 PPADS는 homomeric P2X₄, P2X₆, P2X₇, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, or P2Y₁₁ 수용체에 대해서는 저해하지 못한다는 것이 보고되었다 (51). 따라서 이후 후속 연구에서는 ATP의 보호적인 신호전달에 관여하는 P2 수용체의 정확한 아류형에 대해서 분명하게 밝힐 필요가 있음을 시사한다. 세포밖의 ATP는 초기에 ectonucleotidase에 의해서 ADP 또는 AMP로 변환되고 AMP는 adenosine으로 가수분해된다 (75). Adenosine은 중추신경계에서 P1 purinergic 수용체를 통해 세포의 활성을 조절하는 신호전달 물질로 알려져 있다 (76, 77). Adenosine의 효과를 배제하기 위하여 본 연구에서는 가수분해 되지 않는 ATP

analog인 ATP γ S를 사용하였다. 그 결과 ATP처리시 관찰하였던 결과와 동일하게 A β 42 처리로 인해 감소했던 시냅스 단백질들이 ATP γ S에 의해서 보호되는 것을 확인하였고 (그림 9E,F) 본 연구에서 사용한 PPADS는 P2 수용체는 저해하지만 adenosine이 결합하는 P1 수용체는 저해하지 않는다는 보고 (52)를 바탕으로 ATP의 대사산물의 효과가 아닌 ATP 자체의 보호 기능임을 규명하였다. 이런 결과들을 근거로 후속 연구에서는 알츠하이머병 동물 마우스에 ATP의 다양한 아류형에 특이적인 작용물질 (agonist) 혹은 길항제 (antagonist)들을 주입하는 *in vivo* 실험을 계획할 수 있고 마우스의 행동실험을 비롯하여 여러 가지 실험들을 통해 시냅스 기능을 확인한다면 *in vitro*에서 규명한 결과를 더욱 강력하게 뒷받침 해 줄 수 있을 것으로 기대하는 바이다.

본 연구의 종합된 결과들은 성상교세포로부터 분비된 ATP는 신경세포의 P2 purinergic 수용체를 활성화 시킴으로써 시냅스 가소성을 조절한다는 것을 제안한다. 게다가 이러한 ATP가 주요하게 NR2A와 PSD-95 단백질의 양, 해마의 수상돌기가시의 밀도, LTP를 조절할 수 있음을 밝혔다. 따라서 본 연구에서 규명한 성상교세포에서 유래한 ATP와 신경세포의 시냅스 가소성 사이의 결정적 관련성을 바탕으로 성상아교 전달물질의 분비를 조절하는

물질과 기전이 알츠하이머병의 새로운 치료 표적이 될 수 있다고 생각하는 바이다.

Part 1의 연구 결과는 Journal of neuroscience, February 29, 32(9):3081-3087 (2012)에 논문으로 발표한 바 있다.

Part 2. 소포체 스트레스가 베타 아밀로이드 전구 단백질을 조절하는 기전 연구

본 연구에서는 소포체 스트레스에 의해 유도된 APP의 대사과정이 유비퀴틴-프로테아좀 시스템에 의해 일어남을 규명하였다. 그림11에서 본 것과 같이 칼슘 ionophore 처리 시 APP와 APP의 대사물질인 soluble APP들 그리고 $A\beta$ 까지 급격히 감소되는 것을 확인하였고 이러한 감소가 프로테아좀 저해제인 MG132에 의해서 회복되는 것 또한 알아내었다. 일반적으로 성숙된 APP 단백질은 (maturated APP) $A\beta$ 생성을 증가시킨다고 알려져 있다 (78). 게다가 몇몇 연구들은 $A\beta$ 가 후기골지망 뿐만 아니라 소포체에서도 생성이 된다고 보고한 바 있다 (31, 79). 비정상적인 APP의 대사과정은 $A\beta$ 의 생성을 증가시킬 수 있다. 그러므로 APP 대사과정을 조절하는 기전연구는 중요하다고 할 수 있다. 소포체는 칼슘 항상성을 조절에 있어 중요한 역할을 수행하는 세포 내 기관으로 칼슘 항상성의 불균형은 일반적으로 소포체 스트레스와 관련되어있다. 본 연구에서는 소포체 스트레스에 의해 APP가 급격하게 분해되는 것을 관찰했을 뿐만 아니라 이런 현상이 일어나는 기전에 대해서도 규명하였다. 칼슘 ionophore로 인한 APP의 감소가 완벽하게 프로테아좀 저해제에 의해 보호되는 것을 확인함으로써 소포체 스트레스에 의한 APP의 분해가 UPS와

밀접한 관련이 있음을 예상하였다. 그러나 UPS는 세포 내 단백질 분해를 담당하는 유일한 기전은 아니다. 오토파지는 또 다른 세포 내 단백질 분해를 조절하는 주요한 경로로 알려져 있다 (80). 따라서 본 연구에서는 UPS 이외의 다른 세포 내 단백질 분해경로를 통한 APP의 감소 가능성에 대한 실험을 수행하기 위해 오토파지와 리소좀 기능 저해제를 처리한 뒤 A23187에 의한 APP의 감소를 비교해본 결과 오직 프로테아좀 저해제만이 회복효과가 있음을 확인하였다 (그림 13). 이 결과는 소포체 스트레스에 의한 APP의 분해가 UPS의 특이적인 역할임을 제안한다. 프로테아좀을 통한 분해 경로와 달리 오토파지는 주로 오래된 단백질과 세포질내의 다른 물질들의 제거에 관여한다 (81, 82). 또한 오토파지는 대량 분해에 관여하는 일반적으로 영양이 결핍된 조건에서 활성화 되는 세포 내 기전으로 알려져 있다 (80). 그에 반해 UPS는 대부분 짧게 존재하는 단백질들을 위한 특이적인 분해 시스템이다 (20). 본 연구에서는 APP가 A23187처리 1시간 이후, 즉 매우 이른 시기에서부터 급격히 분해되는 것을 관찰하였다 (그림 11D). 칼슘 ionophore인 A23187은 세포 내 칼슘 증가를 위한 목적으로 매우 널리 사용된 시약이나 몇몇 연구에서는 A23187 처리 시 세포사멸을 유도한다고 보고된 바 있기 때문에

(83, 84) 본 연구에서는 세포사멸에 의한 APP의 분해 가능성을 확인하기 위해 coomassie blue 염색과 세포 생존도 실험을 수행한 결과 전체 단백질의 양에는 비교군과 A23187 처리 군 간의 차이가 없음을 확인하였고 세포 생존도도 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 이 결과는 A23187처리 시 감소한 APP가 UPS를 통한 분해의 결과임을 보충할 수 있다. 칼슘 ionophore 뿐만 아니라 tunicamycin 또는 thapsigargin과 같은 물질들 또한 소포체 스트레스를 유도할 수 있다고 알려져 있다. A23187 처리시 확인했던 결과와 동일하게 tunicamycin과 thapsigargin 처리에 의해서도 APP가 감소하고 감소된 APP는 프로테아좀 저해제에 의해서 회복되는 것을 확인하였다 (그림 12B,C). 또한 A23187과 tunicamycin 처리 시 ERAD 관련 단백질들이 조절 되는 것을 관찰함으로써 본 연구에서는 APP의 감소가 단지 칼슘 항상성의 불균형에 의한 결과가 아니라 소포체 스트레스로 인한 것임을 예상할 수 있었다. 최근 APP가 ERAD 관련 단백질인 E3 접합효소인 HRD1과 탈유비퀴틴화 효소인 USP25의 기질이라는 보고가 된 바 있다 (57, 85). 본 연구의 결과에서 소포체 스트레스를 유도했을 때 USP25는 감소한 반면 HRD1과 BiP은 증가한 것을 확인하였다. 따라서 소포체 스트레스 상황에서

탈유비퀴틴화 기능을 가진 USP25의 감소와 유비퀴틴 E3 접합효소인 HRD1의 증가는 서로 APP의 유비퀴틴화를 증가시키는데 있어 시너지 효과를 제공함으로써 급격한 APP의 분해를 야기했을 것으로 생각한다. 급성 또는 가벼운 소포체 스트레스는 세포의 생존과 적응을 위해 일반적으로 소포체에 존재하는 샤페론 (chaperone)과 ERAD 관련 구성 단백질의 발현을 유도하는 반면 지속적이고 과도한 소포체 스트레스는 세포사멸 또는 세포의 기능저하를 초래하는 것으로 알려져 있다 (86, 87).

칼슘 항상성의 불균형과 같은 소포체 스트레스는 단백질 접힘을 방해하고 결과적으로 잘 못 접힌 또는 접히지 않은 단백질의 소포체에서의 축적을 야기함으로써 UPR을 활성화 시킨다. 이렇게 활성화 된 UPR은 세포에 해로운 잘 못 접힌 단백질들의 증가를 차단한다는 것이 알려져 있다 (88, 89). 알츠하이머병은 잘 못 접히거나 응집된 단백질들이 특징적으로 발견되며 병의 진행에 관련된 APP는 소포체 내에서 잘 못 접힐 가능성이 높고 ERAD의 타겟이 될 수 있다 (90). 본 연구에서는 소포체 스트레스가 프로테아좀의 활성을 증가시키는 것을 확인하였다 (그림 14A). 활성화된 프로테아좀은 ERAD를 통한 잘 못 접힌 APP 단백질의

분해와 관여할 것으로 예상된다. 프로테아좀은 정상적으로는 급성 소포체 스트레스 상황에서 세포를 보호하지만 알츠하이머병에서는 그 기능이 망가져있음이 보고되었다 (24). 알츠하이머병에서 $A\beta$ 의 축적은 만성적인 소포체 스트레스를 유도한다 (91, 92). 본 연구에서 프로테아좀 저해제를 처리한 상태에서 A23187을 처리하였을 때 APP가 소포체 표지 단백질인 calnexin과 동일한 위치에서 염색되는 것을 확인함으로써 프로테아좀 기능이 저하된 상태에서 소포체 스트레스가 발생하면 APP가 비정상적으로 소포체에 축적됨을 알 수 있었다 (그림 16). BACE1은 초기에 소포체에서 합성되고 일부 BACE1에 의한 절단이 계속 소포체에서 발생된다고 보고된 바 있으며 감마 시크리테아제는 소포체에서 두드러지게 존재하는 것이 알려져 있다 (93, 94). 따라서 본 연구를 통해서 프로테아좀의 기능저하에 의한 소포체에서의 비정상적인 APP의 축적이 지속적인 소포체 스트레스와 같은 알츠하이머병의 생리적 환경에서 세포 내 $A\beta$ 생성을 증가 시킬 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구의 종합된 결과들은 급성 소포체 스트레스는 ERAD 연관 단백질과 샤페론의 발현을 유도하여 잘못 접히거나 접히지 않은 APP 단백질의 제거를 위해 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 이용하여

APP를 빠른 시간 내에 분해함으로써 최종적으로 $A\beta$ 생성을 예방할 수 있음을 제안하고 있다. 결론적으로 본 연구는 급성 또는 만성 소포체 스트레스에 대한 APP 대사과정 연구의 중요성을 제공할 뿐만 아니라 프로테아좀이 알츠하이머병의 치료를 위한 중요한 표적이 될 수 있음을 시사하고 있다.

본 연구 결과는 현재 논문 투고 중에 있다.

결 론

알츠하이머병은 칼슘 항상성 불균형과 같은 다양한 스트레스 상황을 비롯하여 뇌 속에 존재하는 신경세포와 성상교세포간의 활발한 네트워크 등의 오류로 인하여 발병 또는 병의 진행을 가속화 할 수 있는 매우 복잡한 병인 기전을 갖고 있다. 본 연구에서는 알츠하이머병의 원인 단백질로 알려진 $A\beta$ 에 의해서 성상교세포로부터 분비되는 성상아교 전달물질인 ATP가 증가하는 것을 관찰하였다. 이렇게 분비된 ATP는 $A\beta$ 에 의해서 저해된 LTP를 비롯하여 시냅스 가소성과 밀접한 관련이 있는 시냅스 단백질과 신경세포의 수상돌기가시 밀도의 감소에 대해서 보호 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한 $A\beta$ 의 전구 단백질인 APP가 $A\beta$ 에 의해서 야기 될 수 있는 소포체 스트레스 상황에서 UPS에 특이적으로 분해됨을 관찰하였다. 이러한 결과를 통해 $A\beta$ 에 의해서 야기 될 수 있는 세포 내 스트레스 상황에서 신경세포와 성상교세포 사이의 네트워크와 APP 대사과정이 치료의 중요한 표적이 될 수 있음을 시사하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Roberson ED, Mucke L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. Science. 2006;314(5800):781-4.
2. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002;297(5580):353-6.
3. Vingtdeux V, Sergeant N, Buee L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. Frontiers in physiology. 2012;3:229.
4. Wisniewski HM, Robe A, Zigman W, Silverman W. Neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. Journal of neuropathology and experimental neurology. 1989;48(6):606-9.
5. Selkoe DJ. The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2000;283(12):1615-7.
6. Raff MC, Abney ER, Cohen J, Lindsay R, Noble M. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. The Journal of neuroscience : the official

- journal of the Society for Neuroscience. 1983;3(6):1289–300.
7. Kimelberg HK, Cai Z, Rastogi P, Charniga CJ, Goderie S, Dave V, et al. Transmitter–induced calcium responses differ in astrocytes acutely isolated from rat brain and in culture. *Journal of neurochemistry*. 1997;68(3):1088–98.
 8. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(2):54–63.
 9. Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(31):6920–7.
 10. Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, et al. Contribution of astrocytes to hippocampal long–term potentiation through release of D–serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(25):15194–9.
 11. Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nature neuroscience*. 2005;8(8):1078–86.
 12. Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla–

Sanchez R, Sul JY, et al. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*. 2005;310(5745):113–6.

13. Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, et al. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*. 2003;40(5):971–82.

14. Bowser DN, Khakh BS. ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(39):8606–20.

15. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2000;21(3):383–421.

16. Wegiel J, Wang KC, Tarnawski M, Lach B. Microglia cells are the driving force in fibrillar plaque formation, whereas astrocytes are a leading factor in plaque degradation. *Acta neuropathologica*. 2000;100(4):356–64.

17. Murray FE, Landsberg JP, Williams RJ, Esiri MM, Watt F. Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using proton-induced X-ray analysis. *Ciba Foundation symposium*. 1992;169:201–10; discussion 10–6.

18. Sennvik K, Benedikz E, Fastbom J, Sundstrom E, Winblad B, Ankarcrona M. Calcium ionophore A23187 specifically decreases the secretion of beta-secretase cleaved amyloid precursor protein during apoptosis in primary rat cortical cultures. *Journal of neuroscience research*. 2001;63(5):429–37.
19. Querfurth HW, Selkoe DJ. Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry*. 1994;33(15):4550–61.
20. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:425–79.
21. Ciechanover A, Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. 2003;40(2):427–46.
22. Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(9):3033–6.
23. Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*. 1987;235(4796):1641–4.

24. Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2000;75(1):436–9.
25. Oddo S. The ubiquitin–proteasome system in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(2):363–73.
26. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology*. 2005;7(8):766–72.
27. McCracken AA, Brodsky JL. A molecular portrait of the response to unfolded proteins. *Genome biology*. 2000;1(2):REVIEWS1013.
28. Menendez–Benito V, Verhoef LG, Masucci MG, Dantuma NP. Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin–proteasome system. *Human molecular genetics*. 2005;14(19):2787–99.
29. Gorlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(9–10):1391–418.
30. Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, et al. Endoplasmic reticulum and trans–Golgi

network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(2):742-7.

31. Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, et al. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. Nature medicine. 1997;3(9):1016-20.

32. Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. Cell calcium. 2003;34(4-5):385-97.

33. Stix B, Reiser G. Beta-amyloid peptide 25-35 regulates basal and hormone-stimulated Ca^{2+} levels in cultured rat astrocytes. Neuroscience letters. 1998;243(1-3):121-4.

34. Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2003;23(12):5088-95.

35. Collin C, Miyaguchi K, Segal M. Dendritic spine density and LTP induction in cultured hippocampal slices. Journal of neurophysiology. 1997;77(3):1614-23.

36. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of

release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular pharmacology*. 2003;64(4):785-95.

37. Gandelman M, Peluffo H, Beckman JS, Cassina P, Barbeito L. Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation*. 2010;7:33.

38. Sun XP, Stanley EF. An ATP-activated, ligand-gated ion channel on a cholinergic presynaptic nerve terminal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(5):1859-63.

39. Zhou X, Galligan JJ. P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *The Journal of physiology*. 1996;496 (Pt 3):719-29.

40. Moser MB, Trommald M, Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(26):12673-5.

41. Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F. Induction

of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain research*. 1991;566(1-2):77-88.

42. Geinisman Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cerebral cortex*. 2000;10(10):952-62.

43. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, Rowan MJ. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*. 1997;8(15):3213-7.

44. Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, Xie CW. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *Journal of neuroscience research*. 2000;60(1):65-72.

45. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of physiology*. 1983;334:33-46.

46. Elgersma Y, Silva AJ. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Current opinion in neurobiology*. 1999;9(2):209-13.

47. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the

- postsynaptic density protein PSD-95. Science. 1995;269(5231):1737-40.
48. Beique JC, Andrade R. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. The Journal of physiology. 2003;546(Pt 3):859-67.
49. Kanjhan R, Housley GD, Thorne PR, Christie DL, Palmer DJ, Luo L, et al. Localization of ATP-gated ion channels in cerebellum using P2x2R subunit-specific antisera. Neuroreport. 1996;7(15-17):2665-9.
50. Bogdanov Y, Rubino A, Burnstock G. Characterisation of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart. Life sciences. 1998;62(8):697-703.
51. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacological reviews. 1998;50(3):413-92.
52. Lambrecht G. Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2000;362(4-5):340-50.
53. Lambrecht G, Braun K, Damer M, Ganso M, Hildebrandt C, Ullmann H, et al. Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. Current pharmaceutical design. 2002;8(26):2371-

99.

54. Knecht E, Aguado C, Carcel J, Esteban I, Esteve JM, Ghislat G, et al. Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(15):2427–43.

55. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*. 2005;74:739–89.

56. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology*. 2002;18:575–99.

57. Kaneko M, Koike H, Saito R, Kitamura Y, Okuma Y, Nomura Y. Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(11):3924–32.

58. Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron glia biology*. 2008;4(1):3–10.

59. Kuchibhotla KV, Lattarulo CR, Hyman BT, Bacsikai BJ. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science*. 2009;323(5918):1211–

5.

60. Orellana JA, Shoji KF, Abudara V, Ezan P, Amigou E, Saez PJ, et al. Amyloid beta-induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(13):4962–77.

61. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002;416(6880):535–9.

62. Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(13):3370–8.

63. Zhao D, Watson JB, Xie CW. Amyloid beta prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation during hippocampal long-term potentiation. *Journal of neurophysiology*.

2004;92(5):2853–8.

64. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 1992;256(5060):1217–21.

65. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 1992;258(5082):597–603.

66. Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(4):2836–43.

67. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*. 2004;45(5):583–95.

68. Niethammer M, Kim E, Sheng M. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(7):2157–63.

69. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems.

International review of cytology. 2004;240:31–304.

70. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*. 2002;82(4):1013–67.

71. Rubio ME, Soto F. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(2):641–53.

72. Khakh BS. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nature reviews Neuroscience*. 2001;2(3):165–74.

73. Robertson SJ, Ennion SJ, Evans RJ, Edwards FA. Synaptic P2X receptors. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11(3):378–86.

74. Illes P, Alexandre Ribeiro J. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *European journal of pharmacology*. 2004;483(1):5–17.

75. Zimmermann H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends in neurosciences*. 1994;17(10):420–6.

76. Kaster MP, Rosa AO, Rosso MM, Goulart EC, Santos AR, Rodrigues AL. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. *Neuroscience letters*.

2004;355(1–2):21–4.

77. Dare E, Schulte G, Karovic O, Hammarberg C, Fredholm BB. Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiology & behavior*. 2007;92(1–2):15–20.

78. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ. beta–Amyloid peptide and a 3–kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(5):3021–4.

79. Wild–Bode C, Yamazaki T, Capell A, Leimer U, Steiner H, Ihara Y, et al. Intracellular generation and accumulation of amyloid beta–peptide terminating at amino acid 42. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(26):16085–8.

80. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290(5497):1717–21.

81. Levine B, Klionsky DJ. Development by self–digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*. 2004;6(4):463–77.

82. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(6):439–48.

83. Kajitani N, Kobuchi H, Fujita H, Yano H, Fujiwara T, Yasuda T, et al. Mechanism of A23187–induced apoptosis in

HL-60 cells: dependency on mitochondrial permeability transition but not on NADPH oxidase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2007;71(11):2701–11.

84. Kozian D, Proulle V, Nitsche A, Galitzine M, Martinez MC, Schumann B, et al. Identification of genes involved in Ca²⁺ ionophore A23187-mediated apoptosis and demonstration of a high susceptibility for transcriptional repression of cell cycle genes in B lymphoblasts from a patient with Scott syndrome. *BMC genomics*. 2005;6:146.

85. Blount JR, Burr AA, Denuc A, Marfany G, Todi SV. Ubiquitin-specific protease 25 functions in Endoplasmic Reticulum-associated degradation. *PloS one*. 2012;7(5):e36542.

86. Lafleur MA, Stevens JL, Lawrence JW. Xenobiotic perturbation of ER stress and the unfolded protein response. *Toxicologic pathology*. 2013;41(2):235–62.

87. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081–6.

88. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(25):25935–8.

89. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends in cell biology*. 2004;14(1):20–8.
90. Hare JF. Intracellular pathways of folded and misfolded amyloid precursor protein degradation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2006;451(1):79–90.
91. Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, et al. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*. 2005;110(2):165–72.
92. Unterberger U, Voigtlander T, Budka H. Pathogenesis of prion diseases. *Acta neuropathologica*. 2005;109(1):32–48.
93. Ko MH, Puglielli L. Two endoplasmic reticulum (ER)/ER Golgi intermediate compartment–based lysine acetyltransferases post–translationally regulate BACE1 levels. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(4):2482–92.
94. Cupers P, Bentahir M, Craessaerts K, Orlans I, Vanderstichele H, Saftig P, et al. The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma–secretase processing of amyloid precursor protein. *The Journal of cell biology*. 2001;154(4):731–40.

Abstract

Eun Sun Jung
Interdisciplinary Graduate Program
in Genetic Engineering
Seoul National University

Activated microglia and reactive astrocytes are commonly found in and around the senile plaque, which is the central pathological hallmark of Alzheimer's disease. Astrocytes respond to neuronal activity through the release of gliotransmitters such as glutamate, D-serine, and ATP. However, it is largely unknown whether and how gliotransmitters affect neuronal functions. In this study, we explored the effect of a gliotransmitter, ATP, on neurons damaged by $A\beta$. We found that $A\beta$ 42 increased the release of ATP in cultures of primary astrocytes and U373 astrocyte cell line. We also found that exogenous ATP protected $A\beta$ 42-mediated reduction in synaptic molecules, such as NMDA receptor 2A and PSD-95, through P2 purinergic receptors and prevented $A\beta$ 42-induced spine reduction and impairment of long-term potentiation. Our findings suggest that $A\beta$ -induced release of gliotransmitter ATP plays a protective role against

A β 42-mediated disruption of synaptic plasticity. In addition, we found that APP is rapidly degraded by ubiquitin-proteasome system (UPS) in CHO cell lines in response to ER stress, such as calcium dyshomeostasis. It is known that A β 42 can induce calcium dyshomeostasis. Increased intracellular calcium by A23187 induces polyubiquitination of APP, causing degradation of APP. A23187-induced reduction of APP prevented by only proteasome inhibitor MG132. Also, we observed that APP was accumulated in the ER by MG132. Impaired proteasome activity have been reported in Alzheimer's disease. Taken together, these results suggest that astrocyte can protect neuron through gliotransmitter, ATP and proteasome may prevent accumulation of misfolded APP through rapid degradation under pathological stress such as A β or calcium dyshomeostasis. Therefore, regulation of astrocyte-neuron interaction and proteasome activity under pathological stress such as A β and calcium dyshomeostasis may provide therapeutic targets for treating AD.

Keywords: Alzheimer's disease, β -amyloid (A β), synaptic plasticity, ATP, Amyloid precursor protein (APP), ER stress, calcium, Ubiquitin-Proteasome System (UPS)

Student number: 2009 – 30843